



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 9月22日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-288750

出 願 人

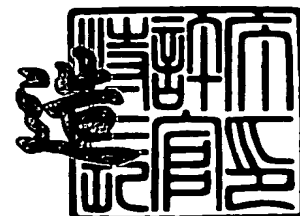
Applicant(s):

寶酒造株式会社

2001年 9月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3083112

【書類名】 特許願  
【整理番号】 T-1554  
【提出日】 平成12年 9月22日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12Q 1/68  
C12N 15/10

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 佐川 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 上森 隆司

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 向井 博之

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 山本 純子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 友野 潤

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 小林 英二

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 榎 竜嗣

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 浅田 起代蔵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063223

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸の増幅方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類のプライマー、および RNase H を混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および、

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法。

【請求項 2】 さらに鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相同な配列を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用することを特徴とする請求項 1 記載の核酸の増幅方法。

【請求項 3】 核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、二本鎖核酸を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され、

(b) RNase H の存在下、前記工程で得られる二本鎖核酸を鋳型とし、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、置換鎖と二本鎖核酸を合成する工程；および、

(c) (b) 工程で得られる二本鎖核酸が鋳型として (b) 工程に再利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法。



【請求項 4】 少なくとも 2 種類のプライマーを使用する、核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され；

(b) RNase H の存在下、前記工程で得られる二本鎖核酸を鋳型とし、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、置換鎖と二本鎖核酸を合成する工程；

(c) (b) 工程で得られる二本鎖核酸が鋳型として (b) 工程に再度利用される工程；

(d) (b) 工程で得られる置換鎖を鋳型として (a) 工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも 1 種のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該 (a) 工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され；

(e) RNase H の存在下、前記工程で得られる二本鎖核酸を鋳型とし、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、置換鎖と二本鎖核酸を合成する工程；および、

(f) (e) 工程で得られる二本鎖核酸が鋳型として (e) 工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法。

【請求項 5】 DNA ポリメラーゼが鎖置換活性を有する少なくとも 1 種の DNA ポリメラーゼである請求項 3 又は 4 に記載の核酸の増幅方法。

【請求項 6】 核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な 2 種

類のプライマーと鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、合成されたプライマー伸長鎖がアニーリングして成る二本鎖核酸を得る工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) (a) 工程で得られるプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および、

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、鋳型とプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸を得る工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の増幅方法。

【請求項7】 核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な2種類のプライマーと鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、合成されたプライマー伸長鎖がアニーリングして成る二本鎖核酸を得る工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) (a) 工程で得られるプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および、

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、プライマー伸長鎖がアニーリングした二本鎖核酸を得る工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の増幅方法。

【請求項8】 核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な 2 種類のプライマーと鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、合成されたプライマー伸長鎖がアニーリングして成る二本鎖核酸を得る工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され、

(b) (a) 工程で得られるプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸、および鋳型同士がアニーリングした二本鎖核酸に (a) 工程の 2 種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸を得る工程；

(d) (c) 工程で得られる 2 種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸、および鋳型同士がアニーリングした二本鎖核酸に (a) 工程の 2 種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸を得る工程；および、

(e) (d) 工程で得られる 2 種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸が (d) 工程で再利用される工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の増幅方法。

【請求項 9】 核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な 2 種類のプライマーと鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、合成されたプライマー伸長鎖がアニーリングして成る二本鎖核酸を得る工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー

であって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) (a)工程で得られるプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸、および鋳型同士がアニーリングした二本鎖核酸に(a)工程の2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸を得る工程；

(d) (c)工程で得られる2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、鋳型とプライマー伸長鎖よりなる二本鎖核酸を得る工程；

(e) (d)工程で得られる鋳型とプライマー伸長鎖よりなる二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および、

(f) (e)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して置換鎖を合成する工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の増幅方法。

【請求項10】 エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項6～9いずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項11】 エンドリボヌクレアーゼがRNase Hである請求項10に記載の核酸の増幅方法。

【請求項12】 RNase Hが大腸菌由来RNase H、サーモトガ属細菌由来RNase H、サーマス属細菌由来RNase H、ピロコッカス属細菌由来RNase H、及びバチルス属細菌由来RNase Hから選択されるRNase Hである請求項1～5、11いずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項13】 核酸の増幅領域が200bp以下であることを特徴とする請求項1～12のいずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項14】 下記一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いることを特徴とする請求項1～13いずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

一般式： $5' - dNa - Nb - dNc - 3'$

(a：1以上の整数、b：1以上の整数、c：0または1以上の整数、dN：デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N：未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、dNaの部位の一部のdNはNで置換されていてもよい)

【請求項15】 cが0である請求項14に記載の核酸の増幅方法。

【請求項16】 デオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが( $\alpha$ -S)リボヌクレオチドである請求項14又は15に記載の核酸の増幅方法。

【請求項17】 請求項14～16いずれか1項に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーに適したDNA伸長反応温度でDNA伸長反応を行うことを特徴とする請求項14～16いずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項18】 鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列に実質的に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを、当該核酸と当該プライマーのアニーリングを増強する物質を含有するアニーリング溶液中でアニーリングさせる工程を包含することを特徴とする請求項1～17いずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項19】 スペルミジン及び／又はプロピレンジアミンを含有するアニーリング溶液が使用される請求項18に記載の核酸の増幅方法。

【請求項20】 アニーリング処理が、鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列に実質的に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有するアニーリング溶液を90℃以上で保温した後、増幅反応が実施される温度以下に冷却して行われることを特徴とする請求項18又は19に記載の核酸の増幅方法。

【請求項21】 ビシン、およびヘプスから選択される緩衝成分を含有する緩衝液中で増幅反応が実施されることを特徴とする請求項1～20いずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項22】 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとして、大腸菌由

来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B s t DNAポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼが使用される請求項1～21いずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項23】 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとRNase Hがバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼと大腸菌由来RNase Hの組み合わせであることを特徴とする請求項1～5、11～22いずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項24】 大腸菌由来RNase HがI型RNase Hである請求項23に記載の核酸の増幅方法。

【請求項25】 エンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼが使用される請求項1～24いずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項26】 DNAポリメラーゼがバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼであり、当該B c a DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質の存在下に当該B c a DNAポリメラーゼを使用する請求項25に記載の核酸の増幅方法。

【請求項27】 DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質がマンガンイオンである請求項26に記載の核酸の増幅方法。

【請求項28】 DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質の存在下で増幅反応が実施される請求項1～27のいずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項29】 DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質がホスホノギ酸である請求項28に記載の核酸の増幅方法。

【請求項30】 鋳型となる核酸が一本鎖または二本鎖のDNAである請求項1～29のいずれか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項31】 鋳型となる二本鎖DNAを一本鎖DNAにする工程の後に実施されることを特徴とする請求項30に記載の核酸の増幅方法。

【請求項32】 鋳型となる核酸がRNAを鋳型とする逆転写反応によって

得られた cDNA である請求項 30 又は 31 に記載の核酸の増幅方法。

【請求項 33】 RNA を鋳型とする逆転写反応によって cDNA を合成する工程の後に実施されることを特徴とする請求項 32 に記載の核酸の増幅方法。

【請求項 34】 逆転写酵素として逆転写酵素活性を有する DNA ポリメラーゼを使用することを特徴とする請求項 32 又は 33 に記載の核酸の増幅方法。

【請求項 35】 逆転写反応と鋳型に相補的な伸長鎖の合成とが、逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有する 1 種の DNA ポリメラーゼにより実施されることを特徴とする請求項 31 ～ 34 のいずれか 1 項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項 36】 DNA ポリメラーゼが、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bst DNA ポリメラーゼ、もしくは、バチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bca DNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 35 に記載の核酸の増幅方法。

【請求項 37】 核酸の増幅反応が等温で行われることを特徴とする請求項 1 ～ 36 のいずれか 1 項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項 38】 核酸増幅用組成物であって、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマー；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置されている、

(b) エンドヌクレアーゼ；および、

(c) 鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ；  
を含有することを特徴とする核酸増幅用組成物。

【請求項 39】 核酸増幅用組成物であって、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 2 種類のプライマー；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの 3' 末端又は 3' 末端側に配置され；

(b) エンドヌクレアーゼ；

(c) 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ；

を含有することを特徴とする核酸増幅用組成物。

【請求項40】 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類のプライマー、およびエンドヌクレアーゼを混合して得られる核酸増幅用組成物；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。

【請求項41】 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のプライマー、およびエンドヌクレアーゼを混合して得られる核酸増幅用組成物；ここで該プライマーは、鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。

【請求項42】 プライマーが下記一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであることを特徴とする請求項38～41いずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

一般式： $5' - dNa - Nb - dNc - 3'$

(a：1以上の整数、b：1以上の整数、c：0または1以上の整数、dN：デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N：未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、dNaの部位の一部のdNはNで置換されていてもよい)

【請求項43】 cが0である請求項42に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項44】 デオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが(α-S)リボヌクレオチドである請求項42又は43に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項45】 核酸の増幅反応に適した緩衝成分を含有する請求項38～



44 いずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項46】 ビシン、およびヘスから選択される緩衝成分を含有する請求項45に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項47】 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとして、大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼが使用される請求項38～46いずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項48】 エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項38～47いずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項49】 エンドリボヌクレアーゼがRNase Hである請求項48に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項50】 RNase Hが大腸菌由来RNase H、サーモトガ属細菌由来RNase H、サーマス属細菌由来RNase H、ピロコッカス属細菌由来RNase H、及びバチルス属細菌由来RNase Hから選択されるRNase Hである請求項49に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項51】 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとエンドヌクレアーゼがバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼと大腸菌由来RNase Hの組み合わせであることを特徴とする請求項38～50のいずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項52】 大腸菌由来RNase HがI型RNase Hである請求項51に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項53】 エンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼが使用される請求項38～52いずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項54】 DNAポリメラーゼがバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼであり、当該Bca DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質を含有する請求項53に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項55】 DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質がマンガニオンである請求項54記載の核酸増幅用組成物。

【請求項56】 DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質を含有する請求項38～55のいずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項57】 DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質がホスホノギ酸である請求項56に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項58】 請求項1～5いずれか1項に記載の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用組成物であって、

- (a) RNase H；および、
  - (b) 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ；
- を含有することを特徴とする核酸増幅用組成物。

【請求項59】 請求項6～9いずれか1項に記載の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用組成物であって、

- (a) エンドヌクレアーゼ；および、
  - (b) 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ；
- を含有することを特徴とする核酸増幅用組成物。

【請求項60】 エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項59記載の核酸増幅用組成物。

【請求項61】 エンドリボヌクレアーゼがRNase Hである請求項60記載の核酸増幅用組成物。

【請求項62】 RNase Hが大腸菌由来RNase H、サーモトガ属細菌由来RNase H、サーマス属細菌由来RNase H、ピロコッカス属細菌由来RNase H、及びバチルス属細菌由来RNase Hから選択されるRNase Hである請求項58又は61に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項63】 核酸増幅反応に適した緩衝成分を含有する請求項58～62いずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項64】 ビシン、およびヘプスから選択される緩衝成分を含有する請求項63に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項65】 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとして、大腸菌由

来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B s t DNAポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼが使用される請求項58～64いずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項66】 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとRNase Hがバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼと大腸菌由来RNase Hの組み合わせであることを特徴とする請求項58に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項67】 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとエンドヌクレアーゼがバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼと大腸菌由来RNase Hの組み合わせであることを特徴とする請求項59に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項68】 エンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼが使用される請求項58～67いずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項69】 DNAポリメラーゼがバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼであり、当該B c a DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質を含有する請求項68に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項70】 DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質がマンガンイオンである請求項69に記載の核酸増幅組成物。

【請求項71】 DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質を含有する請求項58～70のいずれか1項に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項72】 DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質がホスホノギ酸である請求項71に記載の核酸増幅用組成物。

【請求項73】 請求項1～5いずれか1項に記載の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用キットであって、

(a) RNase H; および、

(b) 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ;

を含有することを特徴とする核酸増幅用キット。

【請求項 7 4】 請求項 6 ～ 9 いずれか 1 項に記載の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用キットであって、

(a) エンドヌクレアーゼ；および、

(b) 鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ；

を含有することを特徴とする核酸増幅用キット。

【請求項 7 5】 エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項 7 4 記載の核酸増幅用キット。

【請求項 7 6】 エンドリボヌクレアーゼが RNase H である請求項 7 5 記載の核酸増幅用キット。

【請求項 7 7】 RNase H が大腸菌由来 RNase H、サーモトガ属細菌由来 RNase H、サーマス属細菌由来 RNase H、ピロコッカス属細菌由来 RNase H、及びバチルス属細菌由来 RNase H から選択される RNase H である請求項 7 3 又は 7 6 に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 7 8】 核酸増幅反応に適した緩衝液を含有する請求項 7 3 ～ 7 7 いずれか 1 項に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 7 9】 ビシン、およびヘプスから選択される緩衝成分を含有する核酸増幅用緩衝液を含有する請求項 7 8 に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 8 0】 鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列に実質的に相補的なプライマーのアニーリングを増強する物質を含有するアニーリング溶液を含有する請求項 7 3 ～ 7 9 記載の核酸増幅用キット。

【請求項 8 1】 スペルミジンおよび／又はプロピレンジアミンを含有するアニーリング溶液である請求項 8 0 に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 8 2】 鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼとして、大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bst DNA ポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bca DNA ポリメラーゼからなる群から選択される DNA ポリメラーゼが使用される請求項 7 3 ～ 8 1 いずれか 1 項に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 83】 鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼと RNase H がバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 BcaDNA ポリメラーゼと大腸菌由来 RNase H の組み合わせであることを特徴とする請求項 73 に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 84】 鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼとエンドヌクレアーゼがバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 BcaDNA ポリメラーゼと大腸菌由来 RNase H の組み合わせであることを特徴とする請求項 74 に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 85】 大腸菌由来 RNase H が I 型 RNase H である請求項 83 又は 84 に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 86】 エンドヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼが使用される請求項 73 ～ 85 いずれか 1 項に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 87】 DNA ポリメラーゼがバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 BcaDNA ポリメラーゼであり、当該 BcaDNA ポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質を含有する請求項 86 に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 88】 DNA ポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質がマンガンイオンである請求項 87 に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 89】 DNA ポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質を含有する請求項 73 ～ 88 のいずれか 1 項に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 90】 DNA ポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質がホスホノギ酸である請求項 89 に記載の核酸増幅用キット。

【請求項 91】 請求項 1 ～ 5 いずれか 1 項に記載の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用キットであって、パッケージされた形態において、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼおよび RNase H の使用を指示した指示書を含むことを特徴とする核酸増幅用キット。

【請求項 92】 請求項 6 ～ 9 いずれか 1 項に記載の核酸の増幅方法に使用されるキットであって、パッケージされた形態において、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼの使用を指示した指示書を含

むことを特徴とする核酸増幅用キット。

【請求項 93】 包装材と該包装材に封入された核酸増幅用試薬からなる製造品であって、該核酸増幅用試薬が鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ及び／又は RNase H を含有し、該包装材に賦されたラベル又は該包装材に添付された指示書に前記核酸増幅用試薬が等温での核酸増幅に使用できることが表示してなる、核酸増幅用試薬の製造品。

【請求項 94】 包装材と該包装材に封入された核酸増幅用試薬からなる製造品であって、該核酸増幅用試薬が鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ及び／又はエンドヌクレアーゼを含有し、該包装材に賦されたラベル又は該包装材に添付された指示書に前記核酸増幅用試薬が等温での核酸増幅に使用できることが表示してなる、核酸増幅用試薬の製造品。

【請求項 95】 試料中の標的核酸を検出するための方法であって、  
 (a) 請求項 1～37 いずれか 1 項に記載の核酸の増幅方法により核酸を増幅する工程；および  
 (b) (a) 工程により増幅された標的核酸を検出する工程；  
 を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法。

【請求項 96】 得られる増幅核酸を検出用プローブを用いて検出する工程を包含する請求項 95 に記載の標的核酸の検出方法。

【請求項 97】 検出用プローブがあらかじめ標識物質により標識されているプローブであることを特徴とする請求項 96 に記載の標的核酸の検出方法。

【請求項 98】 プローブが、消光状態になるような距離で配置された 2 種類以上の蛍光物質で標識された RNA プローブであることを特徴とする請求項 97 に記載の標的核酸の検出方法。

【請求項 99】 請求項 95～98 のいずれか 1 項に記載の標的核酸の検出方法に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 100】 下記一般式で表される請求項 99 にキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

一般式：5' - dNa - Nb - dNc - 3'

(a : 11 以上の整数、b : 1 以上の整数、c : 0 または 1 以上の整数、dN :

デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N：未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、d N a の部位の一部の d N は N で置換されていてもよい)

【請求項 1 0 1】 c が 0 である請求項 1 0 0 に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 0 2】 デオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが ( $\alpha$ -S) リボヌクレオチドである請求項 1 0 0 又は 1 0 1 に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 0 3】 病原微生物検出用又は疾病関連遺伝子検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーである請求項 9 9 ~ 1 0 2 いずれか 1 項に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 0 4】 病原性微生物が腸管出血性大腸菌、ボツリヌス菌、黄色ブドウ球菌、パピローマウイルス、C 型肝炎ウイルス又はウイロイドである請求項 1 0 3 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 0 5】 配列表の配列番号 3 1 ~ 3 4、4 7、4 8、5 1 ~ 5 3、6 4 ~ 7 2、8 4、8 5、1 1 3、1 1 4、1 3 0、1 3 1 でそれぞれ表される核酸配列を有する腸管出血性大腸菌検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 0 6】 配列表の配列番号 5 9、6 0、1 1 9、1 2 0、1 2 2、1 2 3 でそれぞれ表される核酸配列を有するウイロイド検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 0 7】 配列表の配列番号 1 1 6、1 1 7 でそれぞれ表される核酸配列を有するボツリヌス菌検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 0 8】 配列表の配列番号 9 6、9 7 でそれぞれ表される核酸配列を有するパピローマウイルス検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 0 9】 配列表の配列番号 1 0 1、1 0 2、1 3 8、1 3 9 でそれぞれ表される核酸配列を有する C 型肝炎ウイルス検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 1 0】 配列表の配列番号 1 3 6、1 3 7 でそれぞれ表される核

酸配列を有する黄色ブドウ球菌検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 1 1 1】 請求項 1 ～ 3 7 のいずれか 1 項に記載の核酸の増幅方法に使用されるキットであって、請求項 9 9 ～ 1 1 0 のいずれか 1 項に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有することを特徴とする核酸増幅用キット。

【請求項 1 1 2】 請求項 9 5 ～ 9 8 のいずれか 1 項に記載の標的核酸の検出方法に使用されるキットであって、請求項 9 9 ～ 1 1 0 のいずれか 1 項に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有することを特徴とする標的核酸の検出用キット。

【請求項 1 1 3】 核酸を所定の領域に整列させた核酸固定物を作製するための方法であって、

(a) 請求項 1 ～ 3 7 記載の核酸の増幅方法によって固定化すべき核酸を増幅する工程；および、

(b) (a) 工程で増幅された核酸を所定の領域に整列させて固定化する工程；を包含することを特徴とする核酸固定物の作製方法。

【請求項 1 1 4】 請求項 1 1 3 に記載の方法で作製された、核酸を所定の領域に整列させた核酸固定物。

【請求項 1 1 5】 核酸を大量に製造する方法であって、

(a) 請求項 1 ～ 3 7 記載の核酸の増幅方法によって核酸を増幅する工程；および、

(b) (a) 工程で増幅された核酸を採取する工程；を包含することを特徴とする核酸の大量製造方法。

【請求項 1 1 6】 核酸を増幅するための方法であって、

(a) 増幅しようとする配列を含む DNA あるいは RNA を複製し、鋳型となる核酸を調製する工程；及び、

(b) (a) で得られた鋳型となる核酸を請求項 1 ～ 3 7 記載の核酸の増幅方法で増幅する工程；を包含することを特徴とする核酸の増幅方法。

【請求項 1 1 7】 核酸の塩基配列を決定するための方法であって、請求項



1 ～ 3 7、1 1 5、1 1 6 いずれか 1 項に記載の方法の、核酸を増幅する工程を包含することを特徴とする核酸の塩基配列の決定方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床分野において有用な標的核酸の検出方法及び遺伝子工学分野において有用な DNA の合成方法に関し、鋳型となる核酸の増幅方法および該方法で増幅された標的核酸の検出方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

遺伝子工学分野の研究において DNA の合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖の DNA の合成を除けば、そのほとんどは DNA ポリメラーゼを利用した酵素的な方法により実施されている。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR 法）があるが、それは米国特許第 4, 6 8 3, 1 9 5 号、第 4, 6 8 3, 2 0 2 号および第 4, 8 0 0, 1 5 9 号に詳細に記述されている。もう一つの例としては、トレンズ イン バイオテクノロジー（Trends in Biotechnology）第 1 0 巻、1 4 6 ～ 1 5 2 頁（1 9 9 2）に記載の当該方法と逆転写酵素反応を組合わせた逆転写 PCR 法（RT-PCR 法）が挙げられる。上記の方法の開発により、DNA から、若しくは RNA から目的とする領域を増幅することが可能になった。

【0 0 0 3】

これらの DNA 合成方法は、目的とする DNA 領域を増幅させるために例えば、二本鎖鋳型 DNA の一本鎖への解離（変性）、一本鎖鋳型 DNA へのプライマーのアニーリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の 3 つのステップからなる反応により、もしくは、“シャトル PCR”（『PCR 法最前線』、「蛋白質 核酸 酵素」別冊、第 4 1 巻、第 5 号、4 2 5 頁～4 2 8 頁（1 9 9 6））と呼ばれる、前述の 3 ステップ反応のうちプライマーのアニーリングおよび伸長のステップを同一温度で行なう 2 ステップ反応により実施される。

【0 0 0 4】

さらに、別法としては、1989年6月14日に公開された欧州特許出願第320,308号に記述されているリガーゼ連鎖反応(LCR; ligase chain reaction)法、あるいはPCR プロトコールズ(PCR Protocols, Academic Press, Inc., 1990) 245~252頁に記述されている転写増幅システム(TAS; transcription-based amplification system)法が挙げられる。上記4法は、次の増幅サイクルのための一本鎖標的分子を再生するために、高温から低温の反応を何回も繰り返す必要がある。このように温度によって反応が制約されるため、反応系は不連続な相またはサイクルで行なう必要がある。

## 【0005】

従って、上記の方法には広い温度範囲で、かつ、厳密な温度調整を経時的に行なうことのできる高価なサーマルサイクラーを使用することが必要となる。また、該反応は、2種類~3種類の温度条件で行なうため設定温度にするために要する時間が必要であり、そのロス時間はサイクル数に比例して増大していく。

## 【0006】

そこで、上記問題点を解決すべく等温状態で実施可能な核酸増幅法が開発された。例えば、特公平7-114718号に記載の鎖置換型増幅(SDA; strand displacement amplification)法、自立複製(3SR; self-sustained sequence replication)法、日本国特許番号第2650159号に記載の核酸配列増幅(NASBA; nucleic acid sequence based amplification)法、TMA(transcription-mediated amplification)法、日本国特許番号第2710159号に記載のQ $\beta$ レプリカーゼ法、さらに米国特許番号第5,824,517号、国際公開パンフレット第99/09211号、国際公開パンフレット第95/25180号あるいは、国際公開第99/49081号等に記載の種々の改良SDA法が挙げられる。米国特許番号第5,916,777号には等温状態でのオリゴヌクレオチドの酵素的合成方法が記載されている。これらの等温核酸増幅法またはオリゴヌクレオチド合成法の反応においては、プライマーの伸長や、一本鎖伸長生成物(または元の標的配列)へのプライマーのアニーリングや、それに続くプライマーの伸長は、一定温度で保温された反応混合物中で同時に起こる。

## 【0007】

これらの等温核酸増幅法のうち最終的にDNAが増幅される系、例えば、SDA法は、DNAポリメラーゼと制限エンドヌクレアーゼを介する二本鎖の置換による、試料中の標的核酸配列（およびその相補鎖）の増幅法であるが、該方法では、増幅に使用するプライマーは4種類必要であり、その内の2種類は、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むように構築する必要がある。また、該方法では、DNA合成のための基質として、修飾されたデオキシリボヌクレオチド3リン酸、例えば $\alpha$ 位のリン酸基の酸素原子が硫黄原子（S）に置換された（ $\alpha$ -S）デオキシリボヌクレオチド3リン酸を大量に用いる必要があり、ルーチンワークで反応を行なう遺伝子検査等においては、そのランニングコストが深刻な問題となってくる。さらに該方法では、増幅されたDNA断片中に上記の修飾ヌクレオチド、たとえば（ $\alpha$ -S）デオキシリボヌクレオチドが含まれるため、例えば、増幅後のDNA断片を制限酵素長多型（RFLP；restriction enzyme fragment length polymorphism）解析に供しようとする場合に、該断片が制限酵素で切断できないことがある。

## 【0008】

また、米国特許番号第5, 824, 517号記載の改良SDA法は、RNAとDNAから構成され、少なくとも3'末端にDNAが配置された構造を必須要件とするキメラプライマーを使用するDNA増幅方法である。また、国際公開パンフレット第99/09211号に記載の改良SDA法は、3'突出末端を生じさせる制限酵素が必要である。また、国際公開パンフレット第95/25180号に記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマー対を必要とする。さらに、国際公開パンフレット第99/49081号に記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマーと少なくとも1種類の修飾デオキシリボヌクレオチド3リン酸を必要とする。一方、米国特許番号第5, 916, 777号は、オリゴヌクレオチドを合成するために、3'末端にリボヌクレオチドを有するプライマーを使用してDNAを合成し、反応終了後にエンドヌクレアーゼによりプライマー伸長鎖中のプライマーと伸長鎖の間にニックをいれて分離させ、テンプレートを消化し、さらにプライマーを回収して再利用するというものである。該方法では、プライマーを再利用する際には反応系よりプライマーを単離したうえで鋳型を再

度アニーリングさせる必要がある。また、国際公開パンフレット第 0 0 / 2 8 0 8 2 号に記載の LAMP 法は増幅に 4 種類のプライマーを必要とし、また、増幅産物は増幅の標的とされた領域が繰り返された、サイズの一定しない DNA である。

【0009】

上記のように従来の等温核酸増幅法はまだ種々の問題をかかえており、低ランニングコストで、かつ結果的に得られた DNA 断片をさらに遺伝子工学的な処理に使用することが可能な核酸の増幅方法が求められていた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の主な目的は、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する DNA 合成反応により試料中の標的核酸の高感度、特異的に増幅する標的核酸の増幅方法、該方法によって得られた増幅断片の検出方法、該増幅方法を用いた標的核酸の製造方法及びこれらの方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーを提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、リボヌクレオチドが 3' 末端又は 3' 末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマー、エンドリボヌクレアーゼ、および DNA ポリメラーゼの存在下に目的とする領域の DNA を増幅する方法を見出し、優れた遺伝子増幅反応系を構築し、本発明を完成するに至った。該方法は、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いる核酸増幅方法であり、本願明細書では ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法と称する。

【0012】

本発明の第 1 の発明は、標的核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類のプライマー、および RNase H を混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の

塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および、

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法に関する。

【0013】

本発明の第1の発明においては、さらに鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相同な配列を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用することができる。

【0014】

本発明の第2の発明は、核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、二本鎖核酸を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) RNase Hの存在下、前記工程で得られる二本鎖核酸を鋳型とし、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、置換鎖と二本鎖核酸を合成する工程；および、

(c) (b) 工程で得られる二本鎖核酸が鋳型として(b)工程に再利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法に関する。

【0015】

本発明の第3の発明は、少なくとも2種類のプライマーを使用する、核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー

伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され；

(b) RNase Hの存在下、前記工程で得られる二本鎖核酸を鋳型とし、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、置換鎖と二本鎖核酸を合成する工程；

(c) (b) 工程で得られる二本鎖核酸が鋳型として (b) 工程に再度利用される工程；

(d) (b) 工程で得られる置換鎖を鋳型として (a) 工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも1種のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該 (a) 工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され；

(e) RNase Hの存在下、前記工程で得られる二本鎖核酸を鋳型とし、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、置換鎖と二本鎖核酸を合成する工程；および、

(f) (e) 工程で得られる二本鎖核酸が鋳型として (e) 工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法に関する。

#### 【0016】

本発明の第2、3の発明においては、DNAポリメラーゼとして鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができる。

#### 【0017】

本発明の第4の発明は、核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な2種類のプライマーと鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、合成されたプライマー伸長鎖がアニーリ

ングして成る二本鎖核酸を得る工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) (a) 工程で得られるプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および、

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、鋳型とプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸を得る工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の増幅方法に関する。

【0018】

本発明の第5の発明は、核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な2種類のプライマーと鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、合成されたプライマー伸長鎖がアニーリングして成る二本鎖核酸を得る工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) (a) 工程で得られるプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および、

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、プライマー伸長鎖がアニーリングした二本鎖核酸を得る工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の増幅方法に関する。

【0019】

本発明の第6の発明は、核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な2種類のプライマーと鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、合成されたプライマー伸長鎖がアニーリングして成る二本鎖核酸を得る工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) (a)工程で得られるプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸、及び鋳型同士がアニーリングした二本鎖核酸に

(a)工程の2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸を得る工程；

(d) (c)工程で得られる2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸、及び鋳型同士がアニーリングした二本鎖核酸に(a)工程の2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸を得る工程；および、

(e) (d)工程で得られる2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸が(d)工程で再利用される工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の増幅方法に関する。

【0020】

本発明の第7の発明は、核酸を増幅する方法において、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な2種類のプライマーと鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、合成されたプライマー伸長鎖がアニーリングして成る二本鎖核酸を得る工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレ



オチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、

(b) (a) 工程で得られるプライマー伸長鎖より成る二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸、及び鋳型同士がアニーリングした二本鎖核酸に (a) 工程の2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸を得る工程；

(d) (c) 工程で得られる2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行い、鋳型とプライマー伸長鎖よりなる二本鎖核酸を得る工程；

(e) (d) 工程で得られる鋳型とプライマー伸長鎖よりなる二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および、

(f) (e) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して置換鎖を合成する工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の増幅方法に関する。

#### 【0021】

第4～7の発明に使用されるエンドヌクレアーゼとしては、エンドリボヌクレアーゼ、例えばRNase Hのようなエンドリボヌクレアーゼを使用することができる。

#### 【0022】

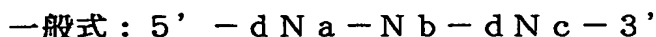
RNase Hを使用する上記の第1～7の発明においては、大腸菌、サーモトガ属、サーマス属、ピロコッカス属、バチルス属等の細菌に由来するRNase Hが使用されることができる。

上記の第1～第7の発明において、標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適し

た領域としては200bp以下の鎖長の領域が例示される。

### 【0023】

本発明の第1～第7の発明には、下記一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。



(a : 1以上の整数、b : 1以上の整数、c : 0または1以上の整数、dN : デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N : 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、dNaの部位の一部のdNはNで置換されていてもよい)

### 【0024】

該キメラオリゴヌクレオチドプライマーとしては、cが0であるプライマー、ならびにデオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが(α-S)リボヌクレオチドであるプライマーが例示される。さらにこれらのキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する場合には、当該プライマーに適したDNA伸長反応温度でDNA伸長反応が実施される。

### 【0025】

上記の第1～第7の発明の増幅方法は、鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列に実質的に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを、当該核酸と当該プライマーのアニーリングを増強する物質を含有するアニーリング溶液中でアニーリングさせる工程を包含することができる。上記のアニーリング溶液としてはスペルミジン及び／又はプロピレンジアミンを含有するものが例示される。当該アニーリング処理は、鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列に実質的に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有するアニーリング溶液を90℃以上で保温した後、増幅反応が実施される温度以下に冷却して行うことができる。

### 【0026】

第1～第7の発明の増幅反応は、ピシン、およびヘPesから選択される緩衝成分を含有する緩衝液中で実施することができる。

### 【0027】

上記の第1～第7の発明においては、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとして、例えば、大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼを使用できる。

## 【0028】

第1～第7の発明の一態様として、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとしてバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼとして大腸菌由来RNase Hを使用する態様が挙げられる。大腸菌由来RNase HとしてはI型RNase Hが例示される。

## 【0029】

第1～第7の発明にはエンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができる。当該DNAポリメラーゼとしてはバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼが使用でき、該DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質の存在下に増幅反応を実施することができる。Bca DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質としてはマンガンイオンが例示される。

## 【0030】

第1～第7の発明の標的核酸の増幅方法は、DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質の存在下で実施することができる。DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質としてはホスホノギ酸が例示される。

## 【0031】

本発明の第1～第7の発明は、一本鎖または二本鎖のDNAを鋳型として実施することができ、鋳型となる核酸が二本鎖DNAである場合には、これを一本鎖DNAにする工程の後に増幅反応を実施することができる。

## 【0032】

上記の鋳型となる核酸はRNAを鋳型とした逆転写反応によって得られたcD

NAであってもよく、RNAを鋳型とした逆転写反応によってcDNAを合成する工程の後に増幅反応を実施する態様が例示される。当該逆転写反応には逆転写酵素活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができ、例えば、逆転写反応と鋳型に相補的な伸長鎖の合成とを、逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有する1種のDNAポリメラーゼにより実施することができる。このようなDNAポリメラーゼとしては、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、もしくは、バチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼが例示される。

## 【0033】

上記の第1～第7の発明において、その増幅反応は等温条件下に行なうことができる。

## 【0034】

本発明の第8の発明は、核酸増幅用組成物であって、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマー；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3' 末端又は3' 末端側に配置されている、

(b) エンドヌクレアーゼ；および、

(c) 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ；

を含有することを特徴とする核酸増幅用組成物、に関する。

本発明の第9の発明は、核酸増幅用組成物であって、

(a) 鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも2種類のプライマー；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの3' 末端又は3' 末端側に配置され；

(b) エンドヌクレアーゼ；および、

(c) 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ；

を含有することを特徴とする核酸増幅用組成物に関する。

## 【0035】

本発明の第10の発明は、鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類のプライマー、およびエンドヌクレアーゼを混合して得られる核酸増幅用組成物であって、該プライマーが鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーである組成物に関する。

## 【0036】

本発明の第11の発明は、鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも2種類のプライマー、およびエンドヌクレアーゼを混合して得られる核酸増幅用組成物であって、該プライマーが鋳型となる二本鎖核酸のそれぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーである組成物に関する。

## 【0037】

上記の、本発明の第8～11の発明の組成物に含有されるプライマーとしては、下記一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーが挙げられる。

一般式：5' - dNa - Nb - dNc - 3'

(a：1以上の整数、b：1以上の整数、c：0または1以上の整数、dN：デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N：未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、dNaの部位の一部のdNはNで置換されていてもよい)

該キメラオリゴヌクレオチドプライマーとしては、cが0であるプライマー、ならびにデオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが(α-S)リボヌクレオチドであるプライマーが例示される。

## 【0038】

上記の第8～第11の発明の組成物は核酸の増幅反応に適した緩衝成分を含有することができ、例えば、ピシン、およびヘースから選択される緩衝成分を含有することができる。

## 【0039】

上記の第8～11の発明としては、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとして大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼを含有する組成物が挙げられる。また、エンドヌクレアーゼとしては、エンドリボヌクレアーゼ、例えばRNase Hのようなエンドリボヌクレアーゼを使用することができる。上記RNase Hとしては大腸菌、サーモトガ属、サーマス属、ピロコッカス属、バチルス属等の細菌に由来のものが例示される。

## 【0040】

第8～11の発明の組成物の一態様としては、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとしてバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼとして大腸菌由来RNase Hを含有するものが挙げられる。大腸菌由来RNase HとしてはI型RNase Hが例示される。

## 【0041】

第8～11の発明の組成物はエンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを含有するものであってもよい。当該DNAポリメラーゼとしてはバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼが使用でき、該DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質を共存させることができる。Bca DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質としてはマンガンイオンが例示される。

## 【0042】

第8～11の発明の組成物は、DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質を含有することができる。DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質と

してはホスホノギ酸が例示される。

【 0 0 4 3 】

本発明の第 1 2 の発明は、上記の第 1 ～ 3 の発明の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用組成物であって、

( a ) R N a s e H ; および、

( b ) 鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ ;

を含有することを特徴とする核酸増幅用組成物に関する。

【 0 0 4 4 】

また、本発明の第 1 1 の発明は、上記の第 4 ～ 7 の発明の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用組成物であって、

( a ) エンドヌクレアーゼ ; および、

( b ) 鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ ;

を含有することを特徴とする核酸増幅用組成物に関する。

【 0 0 4 5 】

第 1 1 の発明の組成物に使用されるエンドヌクレアーゼはエンドリボヌクレアーゼであることができ、例えば、R N a s e H が例示される。

【 0 0 4 6 】

R N a s e H を含有する第 1 2 、 1 3 の発明の組成物には、R N a s e H として大腸菌由来 R N a s e H 、サーモトガ属細菌由来 R N a s e H 、サーマス属細菌由来 R N a s e H 、ピロコッカス属細菌由来 R N a s e H 、及びバチルス属細菌由来 R N a s e H から選択される R N a s e H を使用することができる。

【 0 0 4 7 】

第 1 2 、 1 3 の発明の組成物は、さらに核酸増幅反応に適した緩衝成分を含有することができる、例えば、ピシン、およびヘPes から選択される緩衝成分を含有するものが例示される。

【 0 0 4 8 】

上記の第 1 2 、 1 3 の発明としては、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼとして大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNA ポリメラ

ーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損BcaDNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼを含有する組成物が挙げられる。また、エンドヌクレアーゼとしては、エンドリボヌクレアーゼ、例えばRNase Hのようなエンドリボヌクレアーゼを使用することができる。上記RNase Hとしては大腸菌、サーモトガ属、サーマス属細菌由来RNase H、ピロコッカス属、バチルス属等の細菌に由来のものが例示される。

## 【0049】

第12、13の発明の組成物の一態様としては、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとしてバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損BcaDNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼとして大腸菌由来RNase Hを含有するものが挙げられる。大腸菌由来RNase HとしてはI型RNase Hが例示される。

## 【0050】

第12、13の発明の組成物はエンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを含有するものであってもよい。当該DNAポリメラーゼとしてはバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損BcaDNAポリメラーゼが使用でき、該DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質を共存させることができる。BcaDNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質としてはマンガンイオンが例示される。

## 【0051】

第12、13の発明の組成物は、DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質を含有することができる。DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質としてはホスホノギ酸が例示される。

## 【0052】

本発明の第14の発明は、本発明の第1～3の発明の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用キットであって、

- (a) RNase H ; および、
- (b) 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ ;



を含有することを特徴とする核酸増幅用キットに関する。

【0053】

本発明の第15の発明は、本発明の第4～7の発明の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用キットであって、

(a) エンドヌクレアーゼ；および、

(b) 鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ；

を含有することを特徴とする核酸増幅用キットに関する。

【0054】

第15の発明のキットにおいては、エンドヌクレアーゼとしてエンドリボヌクレアーゼを使用することができ、例えばRNase Hが例示される。

【0055】

RNase Hを含有する上記の第14、15の発明のキットとしては、大腸菌由来RNase H、サーモトガ属細菌由来RNase H、サーマス属細菌由来RNase H、ピロコッカス属細菌由来RNase H、及びバチルス属細菌由来RNase Hから選択されるRNase Hを含有するキットが例示される。

【0056】

第14、15の発明のキットは、さらに核酸増幅反応に適した緩衝液を含有してもよく、例えばピシン、およびヘPesから選択される緩衝成分を含有することができる。また、鋳型となる核酸と該核酸の塩基配列に実質的に相補的なプライマーのアニーリングを増強する物質を含有するアニーリング溶液を含有する物であってもよく、当該アニーリング溶液としてはスperlミジン及び／又はプロピレンジアミンを含有するものが例示される。

【0057】

本発明の第14、15の発明のキットに含有される鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼとしては、大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼが例示される。

## 【0058】

第14、15の発明のキットの一態様としては、バチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損BcaDNAポリメラーゼと大腸菌由来RNaseHとを含有するキットが例示される。大腸菌由来RNaseHとしてはI型RNaseHが挙げられる。

## 【0059】

本発明の第14、15の発明のキットはエンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを含有するものであってもよい。当該DNAポリメラーゼとしてはバチルス カルドテナックス由来の5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損BcaDNAポリメラーゼが使用でき、該DNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質を含有させることができる。BcaDNAポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ活性を発現させる物質としてはマンガンイオンが例示される。

## 【0060】

第14、15の発明のキットは、DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質を含有することができる。DNAポリメラーゼの逆転写活性を阻害する物質としてはホスホノギ酸が例示される。

## 【0061】

本発明の第16の発明は、本発明の第1～3の発明の核酸の増幅方法に使用する核酸増幅用キットであって、パッケージされた形態において、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ及びRNaseHの使用を指示した指示書を含むことを特徴とする核酸増幅用キットに関する。

## 【0062】

本発明の第17の発明は、本発明の第4～7の発明の核酸の増幅方法に使用されるキットであって、パッケージされた形態において、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ及びエンドヌクレアーゼの使用を指示した指示書を含むことを特徴とする核酸増幅用キットに関する。

## 【0063】

本発明の第18の発明は、包装材と該包装材に封入された核酸増幅用試薬からなる製造品であって、該核酸増幅用試薬が鎖置換活性を有するDNAポリメラー

ぜ及び／又はRNase Hを含有し、該包装材に賦されたラベル又は該包装材に添付された指示書に前記核酸増幅用試薬が等温での核酸増幅に使用できることが表示してなる、核酸増幅用試薬の製造品、に関する。

【0064】

本発明の第19の発明は、包装材と該包装材に封入された核酸増幅用試薬からなる製造品であって、該核酸増幅用試薬が鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ及び／又はエンドヌクレアーゼを含有し、該包装材に賦されたラベル又は該包装材に添付された指示書に前記核酸増幅用試薬が等温での核酸増幅に使用できることが表示してなる、核酸増幅用試薬の製造品に関する。

【0065】

本発明の第20の発明は、試料中の標的核酸を検出するための方法であって、  
(a) 本発明の第1～7の発明の核酸の増幅方法により核酸を増幅する工程；及び

(b) (a) 工程により増幅された標的核酸を検出する工程；  
を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法、に関する。

本発明の第20の発明の検出方法においては、得られる増幅核酸を検出用プローブを用いて検出する工程を包含することができる。当該プローブはあらかじめ標識物質により標識されているプローブであってもよく、例えば、消光状態になるような距離で配置された2種類以上の蛍光物質で標識されたRNAプローブを使用することができる。

本発明の第21の発明は、上記の第20の発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。当該キメラオリゴヌクレオチドプライマーとしては、例えば下記一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーが挙げられる。

一般式：5' - dNa - Nb - dNc - 3'

(a : 1以上の整数、b : 1以上の整数、c : 0または1以上の整数、dN : デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N : 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、dNaの部位の一部のdNはNで置換されていてもよい)

該キメラオリゴヌクレオチドプライマーとしては、cが0であるプライマー、ならびにデオキシリボヌクレオチドアナログがデオキシリボイノシンヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが( $\alpha$ -S)リボヌクレオチドであるプライマーが例示される。

本発明の第21の発明のプライマーとしては、病原微生物検出用、疾病関連遺伝子検出用のプライマーが挙げられ、腸管出血性大腸菌、ボツリヌス菌、黄色ブドウ球菌、パピローマウイルス、C型肝炎ウイルス、ウイロイド等の病原性微生物検出用のキメラオリゴヌクレオチドプライマーも本発明に包含される。

本発明の第22の発明は、配列表の配列番号31～34、47、48、51～53、64～72、84、85、113、114、130、131でそれぞれ表される核酸配列を有する腸管出血性大腸菌検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

本発明の第23の発明は、配列表の配列番号59、60、119、120、122、123でそれぞれ表される核酸配列を有するウイロイド検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

本発明の第24の発明は、配列表の配列番号116、117でそれぞれ表される核酸配列を有するボツリヌス菌検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

本発明の第25の発明は、配列表の配列番号96、97でそれぞれ表される核酸配列を有するパピローマウイルス検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

本発明の第26の発明は、配列表の配列番号101、102、138、139でそれぞれ表される核酸配列を有するC型肝炎ウイルス検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

本発明の第27の発明は、配列表の配列番号131、137でそれぞれ表される核酸配列を有する黄色ブドウ球菌検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。

本発明の第28の発明は、上記の本発明の第1～5の発明の核酸の増幅方法に使用されるキットであって、第21～27の発明のキメラオリゴヌクレオチドプ

ライマーを含有することを特徴とする核酸増幅用キットに関する。

本発明の第 2 9 の発明は、上記の本発明の第 2 0 の発明の標的核酸の検出方法に使用されるキットであって、第 2 1 ~ 2 7 の発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有することを特徴とする標的核酸の検出用キット、に関する。

本発明の第 3 0 の発明は、核酸を所定の領域に整列させた核酸固定物を作製するための方法であって、

(a) 上記の本発明の第 1 ~ 7 の発明の核酸の増幅方法によって固定化すべき核酸を増幅する工程；および、

(b) (a) 工程で増幅された核酸を所定の領域に整列させて固定化する工程；を包含することを特徴とする核酸固定物の作製方法に関する。

【 0 0 6 6 】

本発明の第 3 1 の発明は、上記の第 3 0 の発明の方法で作製された、核酸を所定の領域に整列させた核酸固定物に関する。

【 0 0 6 7 】

本発明の第 3 2 の発明は、核酸を大量に製造する方法であって、

(a) 上記の本発明の第 1 ~ 7 の発明の核酸の増幅方法によって核酸を増幅する工程；及び、

(b) (a) 工程で増幅された核酸を採取する工程；を包含することを特徴とする核酸の大量製造方法に関する。

【 0 0 6 8 】

本発明の第 3 3 の発明は、核酸を増幅するための方法であって、

(a) 増幅しようとする配列を含む DNA あるいは RNA を複製し、鋳型となる核酸を調製する工程；及び、

(b) (a) で得られた鋳型となる核酸を第 1 ~ 7 の発明の核酸の増幅方法で増幅する工程；

を包含することを特徴とする核酸の増幅方法に関する。

【 0 0 6 9 】

本発明の第 3 4 の発明は、核酸の塩基配列を決定するための方法であって、第 1 ~ 第 7、3 2、3 3 の発明の方法の、核酸を増幅する工程を包含することを特

徴とする核酸の塩基配列の決定方法、に関する。

【 0 0 7 0 】

【発明の実施の形態】

本明細書においてデオキシリボヌクレオチド（本明細書中ではdNとも記載する）とは、糖部分がD-2-デオキシリボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、例えば、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、チミンを有するものが挙げられる。さらに、7-デアザグアノシン等の修飾塩基を有するデオキシリボヌクレオチドやデオキシイノシンヌクレオチドのようなデオキシリボヌクレオチドアナログも上記のデオキシリボヌクレオチドに包含される。

【 0 0 7 1 】

本明細書においてリボヌクレオチド（本明細書中ではNとも記載する）とは、糖部分がD-リボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルを有するものが挙げられる。さらに、当該リボヌクレオチドには修飾リボヌクレオチドが包含され、例えば $\alpha$ 位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えた修飾リボヌクレオチド〔（ $\alpha$ -S）リボヌクレオチド、（ $\alpha$ -S）Nとも記載する〕やその他の誘導体等も含まれる。

【 0 0 7 2 】

本明細書においてキメラオリゴヌクレオチドプライマーとは、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するプライマーのことを言う。該プライマーはデオキシリボヌクレオチドアナログおよび／または修飾リボヌクレオチドを含有していてもよい。

【 0 0 7 3 】

本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、該プライマーの3'末端又は3'末端側にリボヌクレオチドを配置し、本発明の方法において核酸鎖が伸長でき、エンドヌクレアーゼで切断でき、鎖置換反応を行うことができるものであれば、いずれもが本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーに包含される。

【 0 0 7 4 】

本明細書において3'末端側とは、核酸、例えば、プライマーにおいてその中

央より3'末端にかけての部分を目指す。同様に5'末端側とは、核酸においてその中央より5'末端にかけての部分を目指す。

【0075】

本明細書においてエンドヌクレアーゼとは、鋳型核酸にアニーリングした上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAに作用して、該プライマーのリボヌクレオチド部分を特異的に切断するものであればよい。

【0076】

本明細書においてDNAポリメラーゼとは、DNA鎖を鋳型として新たなDNA鎖を合成する酵素のことを言い、天然型のDNAポリメラーゼの他、前記活性を有する変異体酵素も包含される。当該酵素としては、例えば鎖置換(Strand displacement)活性を有するDNAポリメラーゼ、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有していないDNAポリメラーゼ、逆転写酵素活性やエンドヌクレアーゼ活性を併せ持つDNAポリメラーゼが挙げられる。

【0077】

本明細書において「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってDNA複製を行う際、DNA鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換(strand displacement)することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDNA鎖のことを「置換鎖」と称する。

【0078】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマー

本発明の方法において使用されるプライマーは、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。該プライマーには未修飾リボヌクレオチドおよび/または修飾リボヌクレオチドを含有するオリゴリボヌクレオチドプライマーも含まれる。さらに、該プライマーは、デオキシリボヌクレオチドアナログを含有してもよい。

【0079】

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な塩基配列を有し、その3'末端よりDNA鎖の伸長が可能であり、さらに、その3'末端又は3'末端側にリボヌクレオチドが配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。当該プライマーは通常、増幅しようとする領域の上流、すなわち鋳型核酸上の増幅しようとする領域に対応する塩基配列の3'側部分に相補的に設計される。なお、ここで「実質的に相補的な塩基配列」とは、使用される反応条件において鋳型となるDNAにアニーリング可能な塩基配列を意味する。

## 【0080】

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは1以上の修飾リボヌクレオチドを含有するものであってもよい。即ち、本明細書においてリボヌクレオチドは、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、エンドヌクレアーゼにより認識あるいは切断されるものであれば、未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドのいずれであってもよく、そのような未修飾あるいは修飾リボヌクレオチドのいずれもが包含される。すなわち、本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーには、当該プライマーの機能を失わない範囲で未修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチドを使用することができ、さらにこれらを組合せて使用することができる。このような修飾リボヌクレオチドとしては、特に限定するものではないが、たとえば、リン酸基に結合する酸素原子が硫黄原子に置換された( $\alpha$ -S)リボヌクレオチドや、リボースの2位の水酸基がメトキシ基に置換されたりリボヌクレオチドが挙げられる。このような修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、例えば、米国特許第5,003,097号記載の硫化反応試薬(グレンリサーチ社製)を用いた方法で調製した( $\alpha$ -S)リボヌクレオチド3リン酸、あるいは2-OMe-RNA-CE ホスホアミダイド試薬(グレンリサーチ社製)を用いて作製することができる。

## 【0081】

また、エンドヌクレアーゼによる切断に耐性を付与するような性質の修飾リボヌクレオチドを含有し、本発明の増幅方法に使用できるキメラオリゴヌクレオチ



ドプライマーを設計してもよく、この様なプライマーは、増幅反応工程におけるエンドヌクレアーゼの切断位置を制御し得る点において有用である。

本発明の方法で使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、増幅後のDNA断片を一本鎖もしくは二本鎖のいずれの形態で得たいかによって1種類もしくは2種類を使い分けることができる。すなわち、一本鎖DNAが望まれる場合には1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを、また、二本鎖が望まれる場合には2種類のプライマーが使用される。

#### 【0082】

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、特に限定するものではないが、約12ヌクレオチドから約100ヌクレオチドの長さのものが好ましい。さらに好ましくは、約15ヌクレオチドから約40ヌクレオチドの長さのプライマーである。その塩基配列は使用される反応条件において鋳型核酸にアニーリングするように、実質的に鋳型核酸に相補的な配列であることが好ましい。該プライマーは、後に示す段階で使用されるエンドヌクレアーゼにより認識される配列を3'末端又は3'末端側に含む。

#### 【0083】

本発明を何ら限定するものではないが、例えば、下記一般式で表す構造をもつオリゴヌクレオチドを本発明のDNA合成方法にプライマーとして使用することができる。

一般式：5' - dNa - Nb - dNc - 3'

(a : 1以上の整数、b : 1以上の整数、c : 0または1以上の整数、dN : デオキシリボヌクレオチド及び／又はデオキシリボヌクレオチドアナログ、N : 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、dNaの部位の一部のdNはNで置換されていてもよい)

例えば、上記一般式においてa = 1以上の任意の整数で、b = 1、c = 0のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、b = 2、c = 0のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、b = 3～5、c = 0のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、さらにb = 2、c = 0～5のキメラオリゴヌクレオチドプライマー等がいずれも本発明に好適に使用できる。即ち、本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオ

チドプライマーの3'末端又は3'末端側のリボヌクレオチドの長さは、好ましくは1mer~15mer、さらに好ましくは、1mer~10mer、特に好ましくは1mer~5merである。また、上記一般式中のcの数は、特に限定はなく、本発明の方法に使用できる数を選択すればよいが、通常5以下が好適であり、4、3、2、1、の順に反応結果が良く、特にc=0の場合が最も反応効率がよい。

## 【0084】

本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、該プライマーよりDNAポリメラーゼで伸長されたDNA鎖（プライマー伸長鎖）に含まれるリボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼで認識あるいは切断されるような構造を有しており、当該リボヌクレオチドはその3'末端又は3'末端側に配置されている。本発明を特に限定するものではないが、例えば、鋳型核酸にアニーリングした、上記の一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAにRNase Hを作用させた場合には、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーのリボヌクレオチド部分が切断され、上記オリゴヌクレオチドプライマーと伸長により合成されたDNA鎖の間にニックの入った二本鎖DNAが生じる。さらに、該ニックの入った部位からDNAポリメラーゼにより鎖置換反応がおこる。従って、プライマーの3'末端から核酸鎖を伸長させることができ、エンドヌクレアーゼにより切断されることができ、そしてDNAポリメラーゼにより鎖置換反応ができるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは全て本発明の方法に使用することができる。

## 【0085】

さらに本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、上記のリボヌクレオチドが配置された部位の5'側に1以上のデオキシリボヌクレオチドアナログを含有するものであってもよい。即ち、本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーには、当該プライマーの機能を失わない範囲でデオキシリボヌクレオチドアナログを含有させることができ、さらに、当該ヌクレオチドアナログは複数の種類のものを組合せて使用することができる。該デオキシリボヌクレオチドアナログとしては、特に限定はされないが、例えば、デオキシ

イノシンヌクレオチドあるいは7-デアザグアニンのような修飾塩基を有するデオキシリボヌクレオチドアナログが挙げられる。

## 【0086】

デオキシリボヌクレオチドアナログのプライマーへの導入は、プライマー自身の高次構造形成を抑制する観点からも有効である。さらに、同様の目的でリボヌクレオチドをプライマーに導入しても良い。特に限定するものではないが、非特異的なエンドヌクレアーゼ (RNase) によるプライマーの分解を防ぐ観点からは、例えば、( $\alpha$ -S) リボヌクレオチドのような修飾リボヌクレオチドが好適に使用できる。

## 【0087】

これらのキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、任意の核酸配列を持つように、例えばアプライド バイオシステムズ社 (ABI 社、Applied Biosystem Inc.) の DNA シンセサイザー 394 型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。また、別法としてリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであっても良い。

## 【0088】

## (2) 本発明に使用されるエンドヌクレアーゼ

本発明に使用されるエンドヌクレアーゼとは、鋳型核酸にアニーリングした上記(1)に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAに作用して、鎖置換反応が起こるように伸長鎖を切断しうるものであればよい。即ち、上記の二本鎖DNAのうちのキメラオリゴヌクレオチドプライマー部分にニックを生成しうる酵素である。特に限定されるものではないが、例えば、本発明にはリボヌクレアーゼが使用でき、特にDNAとRNAとから形成された二本鎖核酸のRNA部分に作用するエンドリボヌクレアーゼ H (RNase H) が好適に使用できる。また、該リボヌクレアーゼには、上記作用を有するものであれば、常温性から耐熱性のリボヌクレアーゼのいずれもが好適に本発明に使用できる。例えば、下記実施例に示すように、約50℃～約70℃での反応では大腸菌 (E. coli) 由来のRNase Hが本発明の方法に使用することができる。また、本発明の方法においては、耐熱性のリボヌクレア

ーゼも好適に使用できる。該耐熱性リボヌクレアーゼとしては、特に限定はされないが、例えば市販のHybridase™ Thermostable RNase H（エピセンターテクノロジー社製）の他、好熱性バチルス属細菌、サーマス属細菌、ピロコッカス属細菌、サーモトガ属細菌等由来のRNase H等も好適に使用できる。さらに、該リボヌクレアーゼは、天然体および変異体のいずれもが好適に使用できる。なお、本願明細書に記載されているRNase Hの酵素単位は、実施例中の参考例に示した酵素単位測定方法に基づいて表示された数値である。

## 【0089】

また、上記RNase Hは、本発明の方法に使用できるものであれば特に限定はなく、例えば、種々のウイルス、ファージ、原核、真核生物由来のいずれであってもよい。さらに、細胞性RNase Hあるいはウイルス性RNase Hのいずれであってもよい。例えば、上記細胞性RNase Hとしては大腸菌RNase HIが、ウイルス性RNase HとしてはHIV-1が例示される。本発明の方法においてRNase Hは、I型、II型、III型のいずれもが使用できる。特に限定はされないが、例えば大腸菌由来RNase HI型が好適である。

## 【0090】

また、本発明の方法に使用するエンドヌクレアーゼ、例えば、RNase Hの切断反応の効率に上記プライマーの3'末端近傍の塩基配列に左右され、所望のDNAの増幅効率に影響することが考えられるので、使用するRNase Hに最適なプライマーをデザインすることは当然のことである。

## 【0091】

本明細書において使用されている「ニックを入れる」もしくは「ニックング」という語は、二本鎖核酸の一方の鎖の内部を切断することを意味する。たとえば、RNase HはDNAとリボヌクレオチドを含むDNAとのハイブリッド二本鎖核酸に作用し、二本鎖のうちのリボヌクレオチドを含む鎖のリボヌクレオチド部分を選択的に切断することにより、当該ハイブリッド二本鎖核酸にニックを入れる。

## 【0092】

## (3) 本発明に使用されるDNAポリメラーゼ

本発明には、DNAの鎖置換 (strand displacement) 活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができる。また、実質的に5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有しないものが特に好適に使用することができる。

本発明において、「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってDNA複製を行う際、DNA鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換 (strand displacement) することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDNA鎖のこと「置換鎖」と称する。

## 【0093】

本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、上記の鎖置換活性を有するものであれば特に限定はなく、例えば、バチルス カルドテナックス (*Bacillus caldotenax*、以下、*B. ca*と称す) やバチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*、以下*B. st*と称す) 等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼの5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体や、大腸菌 (以下、*E. coli*と称す) 由来のDNAポリメラーゼIのラージ フラグメント (クレノウ断片) 等が挙げられる。また、本発明に使用できるDNAポリメラーゼは、常温性から耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。

*B. ca*は生育至適温度が約70℃である好熱性細菌であり、この細菌由来の*Bca* DNAポリメラーゼは、DNA依存DNAポリメラーゼ活性、RNA依存DNAポリメラーゼ活性 (逆転写活性)、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を持つことが知られている。上記の酵素は、その本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組み換え蛋白質の何れであっても良い。また、該酵素は、遺伝子工学的あるいはその他の手法によって置換、欠失、付加、挿入等の改変を加えたものであっても良く、このような酵素の例として、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠損させた*Bca* DNAポリメラーゼである*Bca BEST* DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) 等が挙げられる。

## 【0094】

なお、DNAポリメラーゼの中には、特定の条件でエンドヌクレアーゼ活性、例えば、RNase H活性を有するものが知られている。このようなDNAポリメラーゼを本発明の方法に用いることができる。すなわち、該DNAポリメラーゼをRNase H活性が発現されるような条件下、例えば $Mn^{2+}$ の存在下で使用する態様が挙げられる。該態様においては、上記RNase Hを添加することなく本発明の方法を実施することができる。本発明者らは、 $Mn^{2+}$ を含有する緩衝液中で上記のBca DNAポリメラーゼがRNase H活性を示すことを初めて明らかにし、Bca DNAポリメラーゼ以外の酵素を含有しない反応液中で本発明の核酸増幅法が実施できることを実証した。なお、上記の態様はBca DNAポリメラーゼに限定されるものではなく、RNase H活性を併せ持つことが知られている公知のDNAポリメラーゼ、例えばサーマス サーモフィラス (*Thermus thermophilus*)由来のTth DNAポリメラーゼも本発明に使用することができる。

#### 【0095】

#### (4) 本発明に使用される反応バッファーの組成

本発明に使用される反応バッファーには、緩衝成分、マグネシウム塩やその他の金属塩、dNTPを含有するものが使用される。また、使用する酵素の金属要求性等に応じて塩の種類及び濃度を最適化するのは当然のことである。緩衝成分は、特に限定はないが、例えば、ピシン、トリシン、ヘペス、トリス、リン酸塩（リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等）が好適に使用できる。特にピシン、トリシン、ヘペス、あるいはリン酸塩を緩衝成分として含有するバッファーが本発明に好適である。特に限定はされないが、例えば、反応温度が高い場合は、温度変化によるpHの変化が少ないピシン緩衝液が好ましく、また使用するRNase Hの種類によってはヘペス緩衝液が好ましい場合がある。従って、反応温度、使用するエンドヌクレアーゼあるいはDNAポリメラーゼ等によって、最適な緩衝液を選択すればよい。該緩衝成分の最終濃度は5 mM～100 mMの範囲、特に好ましくは20 mM～50 mMの範囲であり、またpH 6.0～9.5、特に好ましくはpH 7.0～9.2の範囲のものが使用される。例えば、22 mM～46 mMのトリシンを含有するpH 7.5～9.2のバッファー、あるいは25

mM～50 mMのリン酸カリウムを含有するpH 7.0～8.0のバッファーが好適に使用できる。また、マグネシウム塩としては、特に限定はないが、例えば、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムあるいは硫酸マグネシウムが好適に使用でき、その濃度は、最終濃度で1 mM～20 mM、特に好ましくは2 mM～10 mMの範囲である。また、DNA伸長反応の基質となるdNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP混合物) は、最終濃度で、それぞれ0.1 mM～3.0 mM、特に好ましくは0.2 mM～1.2 mMの範囲である。使用するプライマーの量は、反応液量50  $\mu$ l 当たり1 pmol～1000 pmolの範囲であり、特に10 pmol～150 pmolの範囲が好ましい。さらに、反応液中には増幅反応の安定化等を目的とした添加物を共存させることができ、それぞれ最終濃度として0.1%以下のウシ血清アルブミン(BSA)、10%以下のジメチルスルホキシド(DMSO)、4 mM以下のプトレスシン2塩酸塩あるいは0.01%以下のプロピレンジアミンを添加してもよい。この他、NMP (1-メチル-2-ピロロリジノン)、グリセロール、ポリエチレングリコール、ジメチルスルホキシドおよび/またはホルムアミドを含んでもよく、これらの有機溶媒の添加により、オリゴヌクレオチドプライマーの非特異的なアニーリングが軽減されることが期待される。

## 【0096】

さらに、DNAポリメラーゼが有している逆転写活性を阻害するような物質、例えばホスホノギ酸(PFA, Phosphonoformic acid)を添加して本発明の方法を実施してもよい。逆転写活性を阻害する物質を添加した場合には、標的核酸以外の非特異的な産物の増幅が低減される。

## 【0097】

さらにオリゴヌクレオチドプライマーの非特異的なアニーリングを軽減させる別の態様としては、本発明の検出方法、増幅方法あるいは製造方法において、増幅反応に先立って、鋳型となる核酸と本発明で使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング処理を行うことが効果的である。該処理はアニーリングを増強する物質、例えばスperlミン、スperlミジン等のポリアミン類やプロピレンジアミンを含有するアニーリング溶液を使用して実施することが好まし

い。上記のポリアミン類を含有するアニーリング溶液としては塩を含有するものが好適に使用でき、特に限定するものではないが、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸カリウム、酢酸ナトリウム等とポリアミン類とを含有するアニーリング溶液が挙げられる。

## 【 0 0 9 8 】

アニーリング処理は、通常、プライマー、鋳型となる核酸を含有する上記のアニーリング溶液を、2本鎖核酸が変性する温度、例えば、90℃以上で保持した後、本発明の方法に使用される反応温度以下まで冷却して実施される。

## 【 0 0 9 9 】

アニーリング処理の工程の後、上記混合液にさらに必要な他の成分、例えばDNAポリメラーゼ、RNase H、dNTP等を添加して本発明の核酸増幅反応が開始される。

## 【 0 1 0 0 】

エンドヌクレアーゼは、例えば、大腸菌由来のRNase Hならば、反応液量50μl当たり3～200Uの範囲が好ましく、特に15U～60Uの範囲が好適である。また、DNAポリメラーゼは、例えば、BcaBEST DNAポリメラーゼならば、反応液量50μl当たり0.5U～100Uの範囲、特に1U～22Uの範囲が好ましい。

## 【 0 1 0 1 】

本発明の方法においてエンドヌクレアーゼとDNAポリメラーゼを組み合わせる場合、特に限定はされないが、例えば大腸菌由来のRNase H及びBcaBEST DNAポリメラーゼの組み合わせが好適である。さらに、上記エンドヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼはいずれもその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想される。その際には、検出感度の向上あるいは増幅産物量を指標にして、使用されるバッファの組成ならびに酵素の添加量を調整すればよい。いずれの場合においても、使用する酵素の種類にあわせて反応バッファの組成等を至適化するのは当然のことである。

## 【 0 1 0 2 】

## (5) 本発明の核酸の増幅方法



本発明の方法は、上記（１）に示されたオリゴヌクレオチドプライマーを少なくとも１種類使用し、さらに上記（２）に示されたエンドヌクレアーゼおよび上記（３）に示されたDNAポリメラーゼを組合わせて実施することができる。また、上記のようにRNase H活性を有するDNAポリメラーゼをRNase H活性が発現するような条件で使用することができる。

当該方法では、伸長反応の基質となるヌクレオチド３リン酸としてPCR法等に使われるdNTP、すなわちdATP、dCTP、dGTP、dTTPの混合物が好適に使用できる。当該dNTPは、使用されるDNAポリメラーゼの基質となる限りにおいては、dNTPのアナログ、たとえば７-デアザ-dGTP等を含んでいてもよい。また、当該方法では、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するが、当該プライマーは、例えば、DNA合成機等を用いて通常の合成方法と同様に調製することができる。さらに、本発明の方法においては、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーと通常のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせて使用することもできる。

#### 【0103】

本発明の方法においては、使用される酵素の活性が反応中に低下するおそれのある場合には、反応の途中で当該酵素をさらに添加することができる。特に限定するものではないが、例えば、大腸菌由来のRNase Hを使用する反応の途中で該RNase Hをさらに添加してもよい。添加する酵素は、反応開始時に反応液中に含まれる酵素と同じものでもよいし、同じ作用を示す異なる種類の酵素であってもよい。すなわち、反応途中で添加することにより、検出感度の向上あるいは増幅産物量の増大等の効果が得られるならば、添加する酵素の種類及び該酵素の性質には何ら限定はない。

#### 【0104】

本発明の方法において鋳型となる核酸、すなわちDNAまたはRNAは、当該核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から調製、あるいは単離したものでもよい。さらに、上記試料を直接、本発明の核酸増幅反応に使用してもよい。このような核酸を含む試料には特に限定はないが、例えば、全血、血清、パフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織（例えば、癌組織、リンパ節等）、細

胞培養物（例えば、哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物等）のような生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料（食品、生物学的製剤等）、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料が挙げられる。また、前記試料等を公知の方法で処理することによって得られる核酸含有調製物であっても良い。該調製物としては、例えば細胞破碎物やそれを分画して得られる試料、該試料中の核酸、あるいは特定の核酸分子群、例えば、mRNAを富化した試料等が本発明に使用できる。さらに上記試料中に含まれる核酸が公知方法で増幅されたDNAあるいはRNA等の核酸等も好適に使用できる。

## 【0105】

これら材料からの核酸含有調製物の調製には特に限定はなく、例えば、界面活性剤による溶解処理、超音波処理、ガラスビーズを用いた振盪攪拌、フレンチプレスの使用等により行うことができる。幾つかの例においては、さらに操作を加えて核酸を精製することが有利である（例えば、内在性ヌクレアーゼが存在するとき）。これらの例において、核酸の精製はフェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動または密度勾配遠心分離等の公知方法により実施される。

## 【0106】

RNA由来の配列を有する核酸を増幅したい場合には、当該RNAを鋳型とした逆転写反応によって合成されたcDNAを鋳型として本発明の方法を実施すればよい。本発明の方法に適用することができるRNAには、逆転写反応に使用されるプライマーが作製可能なものであれば特に制限はなく、試料中の全RNAの他、mRNA、tRNA、rRNA等のRNA分子群、あるいは特定のRNA分子種が挙げられる。

## 【0107】

上記の逆転写反応に使用されるプライマーは、使用される反応条件において鋳型RNAにアニールするものであれば特に限定されるものではない。該プライマーは、特定の鋳型RNAに相補的な塩基配列を有するプライマー（特異的プライ

マー)の他、オリゴdT(デオキシチミン)プライマーやランダムな配列を有するプライマー(ランダムプライマー)であっても良い。逆転写用プライマーの長さは、特異的なアニーリングを行う観点から、好ましくは6ヌクレオチド以上であり、更に好ましくは9ヌクレオチド以上であり、オリゴヌクレオチドの合成の観点から、好ましくは100ヌクレオチド以下であり、更に好ましくは30ヌクレオチド以下である。さらに、逆転写用プライマーとして、逆転写後のcDNAを鋳型とした本発明の核酸増幅法を行う際に鎖置換反応のためのプライマーとして使用可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。このようなプライマーは、上記(1)に記載された性質を有し、かつRNAからの逆転写反応に使用できるものであれば特に限定はない。

## 【0108】

上記の逆転写反応に使用される酵素としては、RNAを鋳型としたcDNA合成活性を有するものであれば特に限定はなく、例えばトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素(AMV RTase)、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素(MMLV RTase)、ラウス関連ウイルス2逆転写酵素(RAV-2 RTase)等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用することもできる。また、本発明の目的のためには、高温で逆転写活性を有する酵素が好適であり、例えばサーマス属細菌由来DNAポリメラーゼ(Tth DNAポリメラーゼ等)、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ等を使用できる。特に限定はないが、例えば、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼが好ましく、B. st由来DNAポリメラーゼ(Bst DNAポリメラーゼ)、さらにBca DNAポリメラーゼが好ましい。例えば、Bca DNAポリメラーゼは、逆転写反応にマンガンイオンを必要とせず、また、高温条件下で鋳型RNAの二次構造形成を抑制しながらcDNAを合成することができる。上記の逆転写酵素活性を有する酵素も、当該活性を有している範囲において天然体、変異体のいずれもが使用できる。

## 【0109】

また、別の態様としては、増幅しようとする塩基配列を含むDNAあるいはRNAをあらかじめ複製した後、本発明の方法の鋳型となる核酸として用いてもよ

い。該複製の方法としては、特に限定はされないが、増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を挿入したベクターで適当な宿主を形質転換させた後、得られた形質転換体を培養して、上記増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を挿入したベクターを抽出して使用方法が例示される。該ベクターは、宿主内で安定して複製されるものであれば特に限定はなく、例えば、pUC系、pBluescript系、pGEM系、コスミド系、ファージ系のいずれもが好適に使用できる。また、宿主は、使用されるベクターを保持することができるものであれば特に限定はなく、例えば、培養が容易な大腸菌等が例示される。

## 【0110】

さらに、上記複製の方法の別の態様としては、増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を鋳型としてRNAポリメラーゼで該塩基配列を有するRNAを転写した後、該RNAをそのまま、あるいは逆転写反応によりcDNAとして本発明の方法の鋳型に用いてもよい。上記の増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片はRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有していれば特に限定はなく、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するベクターに挿入されたものでもよいし、末端にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するアダプターあるいはカセットをライゲーションさせたものでもよいし、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するプライマーと適切な鋳型を用いて酵素的に合成したものであってもよい。すなわち、上記の増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を、上記のように配置されたRNAポリメラーゼのプロモーター配列を用いて、RNAの形で複製、増幅することができる。上記ベクターは、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するものであれば特に限定はなく、例えば、pUC系、pBluescript系、pGEM系、コスミド系、ファージ系のいずれもが好適に使用できる。また、該ベクターは、環状のままあるいは直鎖状に処理したもののいずれもが好適に使用できる。さらに、上記の複製、増幅方法に用いられるRNAポリメラーゼは特に限定はなく、例えば、SP6 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼあるいはT3 RNAポリメラーゼ等が好適に使用できる。

## 【0111】

上記方法により単離したゲノムDNAやPCRフラグメントのような二本鎖DNA、および全RNA若しくはmRNAから逆転写反応で調製されたcDNAのような一本鎖DNAのいずれもが本発明において鋳型DNAとして好適に使用できる。上記二本鎖DNAの場合は、一本鎖DNAに変性する工程（デネーチャー）を施したものが好適に使用できる。

## 【0112】

また、鋳型がPCR増幅産物のような直鎖状2本鎖DNAにおいては、本発明の方法に用いるプライマーがアニーリングする位置を、該DNAの末端から約50塩基程度内側に設定することにより、前述のデネーチャーの工程を行わなくても本発明の核酸の増幅方法を行うことができる場合がある。RNA由来の配列を有する核酸の増幅を目的とする場合には、RNAを鋳型とした逆転写反応偽って得られたRNA-cDNA二本鎖核酸を、RNase Hを含有する本発明の増幅用反応液に加えることにより、RNA鎖を分解して一本鎖cDNAとし増幅反応を開始することができる。さらに、本発明のDNAの合成方法に逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有するDNAポリメラーゼを使用することにより、RNAを鋳型とした逆転写反応と、当該反応によって生成したcDNAを鋳型にしたDNA増幅反応とを1種類のDNAポリメラーゼで行なうことができる。

## 【0113】

上記鋳型の長さは、標的配列がその断片中に完全に含まれるか、または標的配列の十分な部分が少なくとも断片中に存在することにより、プライマー配列の十分な結合を提供するようなものがよい。

## 【0114】

本発明の方法では、特に限定するものではないが、鋳型DNAが二本鎖DNAの場合にはそれらを変性して一本鎖にすることにより鋳型DNA鎖へのプライマーの結合を可能にさせることができる。二本鎖DNAが変性する温度、例えば約95℃で保持することは好ましい変性法である。他の方法はpHの上昇を含むが、オリゴヌクレオチドプライマーを標的物に結合させるためには、増幅反応時にpHを低下させる必要がある。上記のような二本鎖を一本鎖DNAに変性する工程、もしくは、鋳型がRNAの場合、逆転写反応によりcDNA（一本鎖DNA

)を調製する工程の後、等温条件下において、連続的に核酸が増幅される。

ここで、「連続的に」とは、反応温度、反応液組成の変更を伴わずに反応が進行していることを意味する。また、本明細書において「等温」とは、酵素および核酸鎖が上記各工程において機能する、実質的に一定の温度条件のことを意味する。

#### 【0115】

本発明の核酸増幅反応は、例えば、クレノウ断片のような常温性DNAポリメラーゼを使用することにより常温（例えば37℃）でも実施できるが、耐熱性を有する酵素（エンドヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼ）を使用して高温、例えば50℃以上で、さらに例えば60℃以上で実施することができる。この場合、プライマーの非特異的なアニーリングが抑制され、DNA増幅の特異性が向上し、また鋳型DNAの二次構造が解消されることによりDNAポリメラーゼの伸長性も向上する。さらに該方法においては、逆転写反応および核酸の増幅を連続して行なう態様も可能であり、上記反応に逆転写酵素を組み合わせ、あるいは逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを使用して、RNA由来の配列を有するDNAを増幅することができる。

#### 【0116】

本発明を特に限定するものではないが、本発明の各態様において、好ましくは、まず一本鎖の鋳型DNAに該DNAに相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる。次にDNAポリメラーゼの作用により、当該プライマーの3'末端より鋳型DNAの残りの配列に沿って鋳型DNAに相補的なDNA（プライマー伸長鎖）を伸長させて二本鎖DNAを合成する。エンドヌクレアーゼは当該二本鎖DNAに作用してプライマー伸長鎖のプライマー部分からの新たなDNAの伸長を開始させる。本発明の一つの態様においては、エンドヌクレアーゼは上記の二本鎖DNAにニックを入れるニッキング酵素として作用するか、あるいはキメラオリゴヌクレオチドプライマーと鋳型DNAの二本鎖DNA構造を変化させるが、本願発明は理論によって限定はされない。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼがニックの入った二本鎖DNAのニックの3'末端からDNA鎖を再伸長して新たなプライマー伸長鎖を生成し、同時にニック

の3'末端から下流のDNAを遊離させる。こうして先に合成されたプライマー伸長鎖が新たなプライマー伸長鎖に置換される。

## 【0117】

本発明の核酸増幅方法は、鋳型核酸に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーと、置換鎖に相補的なもう1種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの2種のプライマーを使用して実施することができる。この場合、一方のプライマーは鋳型となるDNA鎖に結合して鎖置換反応を起し、そして他方のプライマーは上記の鎖置換反応によって遊離した置換鎖に結合し、新たな鎖置換反応を開始する。この態様を使用すると、各反応産物が他のプライマーのための鋳型として機能できることは明らかである。このように鋳型量が増加することにより、非直線的に増幅産物が増加していく。

## 【0118】

二本鎖DNAを鋳型に用いて本発明の核酸増幅方法を実施する場合には、二本鎖のそれぞれにアニーリングするキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することにより、両方の鎖を増幅反応の鋳型とすることができる。二本鎖DNAを変性した後に反応を開始する場合には、変性する前または後に、キメラオリゴヌクレオチドプライマー、4種のデオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTP)、DNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを反応液に添加する。熱処理により二本鎖DNAを変性し、かつ耐熱性の酵素を使用しない場合には、変性後に酵素を添加することが好ましい。

## 【0119】

二本鎖の鋳型DNAと2種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する本発明の核酸増幅方法の態様においては、反応の条件等にもよるが、各プライマーから伸長反応中のそれぞれの鋳型-伸長鎖中間体の間で鋳型の交換が起こり、合成されたプライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸を生成することがある。この二本鎖核酸は両端にキメラオリゴヌクレオチドプライマーを有しており、次いでその両端から再び鎖置換による相補鎖伸長反応を開始することができる。この反応の結果、一端にプライマーの配列を有する増幅産物が生成される。さらに、この反応中に鋳型の交換が起こった場合には前記と同様な二本鎖核酸

が再度生成される。

#### 【0120】

本発明により、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを使用し、鋳型交換反応を行う工程を包含する核酸の増幅方法が提供される。

#### 【0121】

本発明には、鎖置換反応中に上記の鋳型交換反応を行う能力を有するDNAポリメラーゼが好適に使用でき、例えば、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失したBca DNAポリメラーゼの変異体酵素が特に好適に使用される。当該酵素はBcaBEST DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）として市販されており、また、該酵素の遺伝子を含む大腸菌、*Escherichia coli* HB101/pUI205（FERM BP-3720）より日本特許第2978001号に記載の方法によって調製することもできる。

#### 【0122】

本発明を特に限定するものではないが、本発明の核酸の増幅方法の反応様式は、例えば以下のように考察される。

本発明の核酸を増幅する方法においては、鋳型となる二本鎖核酸を、RNase Hの存在下、それぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーと鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖が合成され、鋳型交換反応により、合成されたプライマー伸長鎖同士がアニーリングして成る二本鎖核酸、及び鋳型同士がアニーリングした二本鎖核酸に前記2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸を得ることができ、後者の二本鎖核酸は鋳型として再利用される。

#### 【0123】

プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位はRNase Hで切断され、当該二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の3' 末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換が行われ、鋳型交換反応により、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸、及び鋳型同士がアニーリングした二本鎖核酸に前記2種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸を得ることができる。



また鋳型交換反応が起こらない場合は鋳型とプライマー伸長鎖から成る 2 種の二本鎖核酸を得ることができる。

【 0 1 2 4 】

上記の 2 種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換が行われ、鋳型交換反応により、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸、及び鋳型同士がアニーリングした二本鎖核酸に前記 2 種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸を得ることができ、2 種のプライマーがアニーリングした二本鎖核酸は鋳型として再利用される。

また鋳型交換反応が起こらない場合は鋳型とプライマー伸長鎖から成る 2 種の二本鎖核酸を得ることができる。

【 0 1 2 5 】

この 2 種の二本鎖核酸のリボヌクレオチド含有部位は RNase H で切断され、当該二本鎖核酸のそれぞれのプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列が伸長され鎖置換が行われる。

【 0 1 2 6 】

また本発明の核酸を増幅する方法においては、鋳型となる二本鎖核酸を、RNase H の存在下、それぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な 2 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーと鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖が合成され、鋳型交換反応が起こらない場合は、鋳型とプライマー伸長鎖よりなる 2 種の二本鎖核酸が得られる。

【 0 1 2 7 】

また、本発明の増幅方法において、キメラオリゴヌクレオチドプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位が切断される際に、当該切断によって生じる 5' 側の断片（プライマー部分）がリボヌクレオチドを含有しないように切断される場合がある。こうして生じたプライマー部分から伸長されたプライマー伸長鎖はもはやエンドヌクレアーゼにより切断されず、この結果、末端にプライマーの配

列を有する増幅産物が生成される。

上記のように、本発明の核酸増幅方法においてはプライマーの配列を含まない増幅産物の他、一端、もしくは両端にプライマーの配列を有する産物が生成する。これらの産物も本発明にいう増幅産物に包含される。

#### 【 0 1 2 8 】

本発明の核酸の増幅方法の一例を図 3 3 ～ 3 6 に示す。すなわち図 3 3 ～ 図 3 6 は本発明の核酸の増幅方法における核酸の増幅の例を示す図である。

図 3 3 ～ 図 3 6 で示される核酸の増幅の例においては、二本鎖核酸である鋳型 DNA、当該鋳型 DNA の塩基配列の情報に基づいて合成された一对のキメラオリゴヌクレオチドプライマー（図中キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、その 3' 末端に 3 個のリボヌクレオチドを有している。図中リボヌクレオチドを白丸で示す）、鎖置換活性を有する鎖置換型 DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ）、DNA-RNA ハイブリッド部位を切断するリボヌクレアーゼである RNase H、および伸長鎖に取り込まれる基質である dNTP の存在下での核酸の増幅の例が示されている。

#### 【 0 1 2 9 】

図 3 3 に示すように、鋳型 DNA の塩基配列の情報に基づいて合成された一对のキメラオリゴヌクレオチドプライマーは鋳型 DNA の特定部分にアニーリングし、ステップ 1 に示すように、鎖置換反応により各キメラオリゴヌクレオチドプライマーの 3' 末端から DNA 鎖が伸長する。

#### 【 0 1 3 0 】

次に、図 3 4 に示すように、上流側と下流側から伸長してきたプライマー伸長鎖は、ステップ 2 に示す鋳型交換反応により、ある割合で元の鋳型から離れ、その 3' 部分でプライマー伸長鎖同士がアニーリングする。このアニーリングした伸長鎖同士がさらに互いの相補鎖を伸長し、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖 DNA を形成する。また、置換鎖同士がアニーリングした二本鎖 DNA に、前出 pair のキメラオリゴヌクレオチドプライマーがアニーリングした二本鎖 DNA が生成する。これは図 3 4 の出発物質として利用される。

#### 【 0 1 3 1 】

図34に示した、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖DNAは、図35のステップ3に示すように、RNase Hの作用によって当該二本鎖DNAのDNA/RNAハイブリッド部分の、キメラオリゴヌクレオチドプライマーに由来するRNAを含む片方の鎖のみが切断され、二本鎖DNAに切れ目（ニック）が導入される。

#### 【0132】

引き続き図35のステップ4に示すように、二本鎖DNAの切れ目の部分から鎖置換反応が起こり、DNAが伸長する。次いで図35のステップ5に示すように、ある割合で図34のステップ2と同様に鋳型交換反応が起こり、増幅生成物であるプライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖DNAが生成する。

また、置換鎖同士がアニーリングした二本鎖DNAに前出一対のキメラオリゴヌクレオチドプライマーがアニーリングした二本鎖DNAが生成する。

#### 【0133】

次に、図36に示すように、図35に示した置換鎖同士がアニーリングした二本鎖DNAに、前出一対のキメラオリゴヌクレオチドプライマーがアニーリングした二本鎖DNAでは、鎖置換反応により各キメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端からDNA鎖が伸長する。ついでステップ2、およびステップ5と同様な鋳型交換反応がある割合で起こり、プライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖DNAが生成する。当該二本鎖DNAは図35のステップ3に戻り、再度ステップ3以降の反応が開始される。また、置換鎖同士がアニーリングした二本鎖DNAに前出一対のキメラオリゴヌクレオチドプライマーがアニーリングした二本鎖DNAが生成し、図36の出発物質として利用される。これらの結果、これらの二本鎖核酸の生成が繰り返される連鎖反応が生じ、一对のキメラオリゴヌクレオチドプライマーによって挟まれた領域が特異的に増幅産生される。

#### 【0134】

本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、プライマー部分の3'末端から下流への伸長鎖合成に伴い、先に伸長されたDNA鎖の置換を行う必要がある。そして重要なことは置換鎖を分解する可能性のある5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示さないことである。このようなDNAポリメラーゼ、例えば大腸菌由来

のDNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損変異体であるクレノウ断片、Bst DNAポリメラーゼ由来の同様の断片（ニューイングランドバイオラプス社製）、Bca由来のBcaBEST DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）が有用である。シークエネース1.0およびシークエネース2.0（米国バイオケミカル社）、ジーン（Gene）第97巻、13～19頁（1991）記載のT5 DNAポリメラーゼおよびφ29 DNAポリメラーゼも使用することができる。通常は5'→3' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼであっても、その活性が適当な阻害剤の添加により阻害することが可能な場合は、本発明のDNA合成方法に使用できる。

## 【0135】

本発明の核酸の増幅方法は、変温で行ってもよく、又は等温で行ってもよい。ここで変温とは、各工程の反応を妨げない範囲で各工程の反応温度を変化させることを意味する。すなわち、例えば、プライマーのアニーリング、相補鎖の合成反応、相補鎖のニッキング、そして置換反応のそれぞれに適した温度に変化させる場合のことをいう。

次に等温とは、各工程の反応温度を変化させず、各工程が実質的に一定の温度で行われることを意味する。いずれの場合においても、最適の反応条件となるように温度を設定するのは当然である。

## 【0136】

本発明の核酸の増幅方法の1つの特徴としては、核酸の合成方法において温度を上げ下げする必要がないことにある。即ち、本発明は等温での核酸の合成方法を提供する。従来の多くの核酸増幅法は、温度を上下することにより合成鎖から標的物を解離する必要があり、例えばサーマルサイクラーのような特別な反応装置を必要とするが、本発明の方法においては一定温度を保持できる装置のみでも実施することができる。このように、本発明の方法は、単一の温度で実施することができる。好ましくは、プライマーの非特異的なアニーリングが低減され、かつ鋳型となる核酸にプライマーが特異的にアニーリングするように反応温度、ストリンジェンシーのレベルを設定して実施される。特に限定するものではないが、上記のように耐熱性の酵素を用いて本発明の方法を高温条件下で行う事ができ

る。さらに、反応の効率を高く保つ観点から、本発明の方法は使用する酵素の活性が十分に保持される適当な温度で行うことが好ましい。従って、使用する酵素にもよるが、好ましい反応温度は、約20℃～約80℃であり、さらに好ましくは約30℃～約75℃であり、特に好ましくは、約50℃～約70℃である。特に高温条件下で反応を行う場合には、常温で反応を行う場合よりも鎖長の長いプライマーを使用することが好ましい。各反応温度に適したプライマーの配列及び長さの設定については、例えば、そのT<sub>m</sub>値を参考にしてもよく、あるいは市販のプライマー設計ソフト、例えば、OLIGO<sup>TM</sup> Primer Analysis software（宝酒造社製）を使用してもよい。例えば、本発明の方法において反応温度を55℃から60℃あるいは65℃に設定した場合、該方法に使用するプライマーの長さとしては、特に限定するものではないが、例えば12ヌクレオチド～100ヌクレオチドの長さ、好ましくは14ヌクレオチド～50ヌクレオチドの長さ、さらに好ましくは15ヌクレオチド～40ヌクレオチドの長さのプライマーが使用できる。このように反応温度を上げることの効果としては、鋳型DNAの二次構造を解消できることが挙げられ、GC含量の高い鋳型核酸を使用した場合にも所望の核酸が増幅される。また、長鎖長の領域を増幅する場合においても同様の効果がある。該効果は、約60bp～約20kbpの範囲で、さらに約110bp～約4.3kbpの範囲で、特に約130bp～約1500bpの範囲で認められる。

## 【0137】

さらに、鋳型となる核酸のGC含量に応じて反応温度を調節し、増幅効率を向上させることができる。例えば、鋳型となる核酸としてGC含量の低いものを使用する場合には、増幅する鎖長やプライマーのT<sub>m</sub>値にもよるが、50～55℃で本発明の増幅反応を行うことができる。

## 【0138】

また、本発明の方法において、逆転写酵素活性を持つDNAポリメラーゼ、例えば、BcaBEST DNAポリメラーゼを使用した場合、RNAからcDNAを調製する工程（逆転写反応）を含むRNA由来の核酸の増幅を簡便に実施することができる。また、RNAからcDNAを調製する工程を独立させて行い、

その生成物（cDNA）を本発明の方法に鋳型DNAとして使用することもできる。

## 【0139】

いずれの場合においても、本発明の方法においては、適当な方法、例えば酵素を失活させたり反応温度を低下させて反応を停止させるか、または基質のうちのいずれか一つが使い尽くされるかのいずれかまで繰り返される。

## 【0140】

本発明の核酸の増幅方法は、核酸の増幅を利用した種々の実験操作、例えば核酸の検出、標識、塩基配列の決定に使用することができる。

また、本発明の核酸の増幅方法は、*in situ*核酸増幅方法、DNAチップのような固相担体上での核酸増幅方法あるいは多種類の領域を同時に増幅するマルチプレックス核酸増幅方法として使用することができる。

## 【0141】

本発明の核酸の増幅方法の特徴の一つとして、一本鎖のDNAを調製することが可能なことが挙げられる。この目的のためには、1種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法のみならず、2種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法を使用することもできる。例えば、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる場合は、一方のオリゴヌクレオチドプライマー量を他方の量に対して過剰にして増幅反応を行なう、いわゆるアシンメトリック（非対称）-PCR法において採用される方法と同様のプライマー比率によって行なうことができる。この結果、一方の鎖を置換した産物の量が、他方の鎖を置換した産物の量に比べて過剰になる。

## 【0142】

本発明の核酸の増幅方法によれば実質的にその相補鎖を含有しない一本鎖のDNAを調製することができ、例えば、DNAチップのような核酸固定化物を作製するための一本鎖DNA、標的核酸検出のための一本鎖DNAプローブ、または長鎖PCR法のためのメガプライマーを容易にしかも短時間に作製することができる。また、本発明の方法を使用することにより、センス配列のみ、あるいはアンチセンス配列のみを選択して増幅させることが可能である。従って、本発明は

センス配列あるいはアンチセンス配列を有する核酸の製造方法としても有用である。

【 0 1 4 3 】

また、本発明の方法は、ピシン、トリシン、ヘプス、リン酸塩あるいはトリス緩衝液中で行うことにより微量の鋳型となる核酸からでも所望の核酸配列領域を増幅することができる。

【 0 1 4 4 】

さらに、本発明の核酸の増幅方法には経時的な温度調節が可能な反応装置を使用する必要がないため、大容量の反応液を使用して増幅反応を実施することができる。したがって、例えば医薬用途等に使用される核酸の工業的大量製造が可能である。

【 0 1 4 5 】

本発明の核酸の増幅方法において使用するプライマーの利用効率は、ほぼ 1 0 0 % であり、従来の方法、例えば P C R 法の利用効率に比べて 5 倍～ 1 0 倍高くすることができる。

【 0 1 4 6 】

( 6 ) 本発明の標的核酸の検出方法および該方法のためのキット

本発明の核酸の増幅方法を使用することにより、試料中の標的核酸の検出を行うことができる。当該検出方法は、

( a ) 上記の本発明の核酸の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程 ; および

( b ) 上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程 ;  
を包含する。

【 0 1 4 7 】

上記方法は試料中に存在する特定の遺伝子の検出、定量に利用することができる。すなわち D N A または R N A 等の核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から特定の遺伝子を検出、定量することができる。前述の試料としては、特に限定はないが、例えば、全血、血清、パフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織（例えば、癌組織、リンパ節等）、細胞培養物（例えば、哺乳動物細胞

培養物及び細菌培養物等)のような生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料(食品、生物学的製剤等)、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料から特定の遺伝子を検出、定量することができる。さらに例えば、ウイロイド、ウイルス、カビ、細菌あるいはその他の微生物等由来の特定の遺伝子をターゲットとすることにより、該遺伝子の存在の有無によって上記の微生物の存在を検出、定量等に行うことができる。特に、病原性の微生物の検出方法は衛生、環境分野で有用である。さらに、生物の遺伝子型の判別や遺伝子の発現状態を調べるために本発明の方法を使用することもできる。特に疾病関連遺伝子、例えば細胞の癌化に関連する遺伝子等の検出、発現状態の確認は医療分野において有用である。上記検出法のための鋳型として使用される核酸は、RNAあるいはDNAのいずれもが好適に使用できる。

## 【 0 1 4 8 】

さらに、本発明の標的核酸の検出方法により、標的核酸上の塩基配列の違いを判別することができる。この態様においては、使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端部分が、標的とされる塩基配列の判別しようとする特定の塩基付近に位置するように、たとえば、該塩基とプライマーの3'末端の塩基とが水素結合を形成するようにプライマーが設計される。このようなキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅反応を実施した場合、プライマーの3'末端部分の塩基配列と鋳型の塩基配列との間にミスマッチが存在する場合には標的核酸からの増幅が起こらず、増幅産物の生成が見られない。当該方法により、点突然変異、一塩基置換(Single nucleotide polymorphism, SNP)のような遺伝子上の特定の塩基についての情報を得ることが可能である。

## 【 0 1 4 9 】

本発明の標的核酸の検出方法は、核酸を含有する試料より直接、標的核酸を増幅することにより実施することができる。この場合、増幅される標的核酸の鎖長には、特に限定はないが、感度よく標的核酸を検出する観点からは、例えば200bp以下、さらに好ましくは150bp以下の領域が有効である。該増幅鎖長



となるように本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを設定することにより、高感度に試料中の標的核酸を検出することができる。

## 【0150】

さらに、本発明の検出方法では、前述の(4)で例示したような、ピシン、トリシン、ヘペス、リン酸塩あるいはトリス緩衝成分を含有する反応バッファー、及びスベルミジンやプロピレンジアミンを含有するアニーリング溶液の使用により、微量の核酸試料からもさらに高感度に標的核酸を検出することができる。この場合、使用するエンドヌクレアーゼとDNAポリメラーゼは特に限定はされないが、例えば大腸菌由来のRNase H及びBcaBEST DNAポリメラーゼの組み合わせが好ましい。特に、上記エンドヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼはともにその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想されるが、その際には検出感度の向上あるいは増幅産物量の増加を指標にして、該バッファーの組成および酵素の添加量を調整すればよい。

## 【0151】

上記(b)工程には公知の核酸検出方法、例えば電気泳動により特定のサイズの反応産物を検出する方法や、プローブとのハイブリダイゼーションによる検出等を使用することができる。電気泳動による検出には、通常、エチジウムブロマ이드等の蛍光物質が使用されるが、プローブとのハイブリダイゼーションを組み合わせてもよい。また、プローブは放射性同位元素による標識の他、ビオチンや蛍光物質のような非放射性的の標識を施したものが使用できる。この他、上記(a)工程において標識ヌクレオチドを使用することにより、増幅産物に標識ヌクレオチドを取り込ませて検出を容易とすることや、蛍光偏光法、蛍光エネルギー転移等を利用した検出を行うことも可能である。さらに、適切な検出系を構築することにより、標的核酸を自動的に検出することや、あるいは標的核酸の定量を行うことが可能である。

## 【0152】

消光状態になるような距離で配置された2種類以上の蛍光物質で標識されたりボヌクレオチド(RNA)プローブを本発明の検出方法に使用することができる。当該プローブは蛍光を発することはないが、これに相補的な標的核酸由来の増

幅DNAにアニーリングした場合、RNase Hは該プローブを分解する。この結果、プローブ上の蛍光物質間の距離が増大して蛍光が発せられるようになり、標的核酸の存在を知ることができる。RNase Hを使用して本発明の核酸の増幅方法が実施された場合には、その反応液中に上記のプローブを添加するだけで標的核酸を検出することができる。当該プローブの標識に使用される蛍光物質としては、例えば、6-FAM (6-carboxyfluorescein) と TAMRA (N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine) との組み合わせが好適に使用できる。

## 【0153】

本発明の核酸の増幅方法の等温下における増幅方法においては、サーマルサイクラーのような装置を必要としない。また本発明の増幅方法では、使用するプライマーを1種類もしくは2種類と従来法よりも少なくすることができる。dNTPのような試薬もPCR等で用いられるものを流用できるため、ランニングコストを従来法よりも低くすることができる。そのため、ルーチンワークを行なっている遺伝子検査等の分野で好適に使用できる。さらに、本発明の方法はPCR法よりも短時間により多くの増幅産物を得られることから、簡便、迅速、高感度な遺伝子検出方法として利用することができる。

## 【0154】

ゲノムレベルの遺伝子解析においては、大量の塩基配列を解析するために反応系を微量化し、さらに集積度を高める試みがなされている。その手段の一つとして、最先端の超微細加工技術を駆使して、ゲノム解析の基本プロセス、例えば、DNAの細胞からの抽出、DNA増幅反応、電気泳動、ハイブリダイゼーション、目的DNAの検出等のプロセスを数cm角〜指先大のマイクロチップ上に集積化したものが開発されている。該システムはマイクロチップ、あるいはナノチップと呼ばれている。

このようなシステムにおける遺伝子増幅反応として現在はPCR法が考えられているが、該方法は経時的に温度の上昇、下降を繰り返す温度制御のための手段を必要とするため、システムが複雑なものとなる。これに対し、等温条件下で核酸を増幅できる本発明の方法はシステムの単純化が可能であり、上記のような集積化されたシステムでの利用に非常に好適である。さらに、本発明の技術を利用

してさらに高い集積度のシステムの構築が可能となる。

【0155】

(7) 本発明のキット

本発明は、前述の本発明の核酸の増幅方法、または本発明の核酸の検出方法に使用されるキットを提供する。1つの実施態様において、該キットは、パッケージされた形態において、鎖置換反応におけるDNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼの使用のための指示書を含むことを特徴とする。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼならびに鎖置換反应用緩衝液を含むキットは本発明の方法に好適に使用される。あるいは、市販の鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼを指示書に従って選択し、使用してもよい。さらに、RNAを鋳型とする場合の逆転写反应用試薬を含んでもよい。DNAポリメラーゼは、上記(3)記載の本発明に使用されるDNAポリメラーゼから選択することができる。また、エンドヌクレアーゼは、上記(2)記載のエンドヌクレアーゼから選択することができる。さらに、該鎖置換反应用緩衝液は、上記(4)記載の反応バッファー組成を有するものが好適に使用できる。

【0156】

上記「指示書」とは、当該キットの使用方法、例えば鎖置換反应用試薬液の調製方法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレットまたはリーフレット形式の取り扱い説明書のほか、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。さらに、インターネットのような電子媒体を通し、開示、提供された情報も含まれる。

【0157】

さらに、本発明のキットにおいては、前述の(4)で例示したような、ピシン、トリシン、ヘプス、リン酸塩あるいはトリス緩衝成分を含有する反応バッファー、及びアニーリング溶液が含まれていてもよい。さらに、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼやRNase Hが含まれていてもよい。

【0158】

さらに、標的核酸の検出方法に使用されるキットは、上記の指示書、増幅反応

のための試薬類の他、標的核酸の増幅に適したキメラオリゴヌクレオチドプライマー、増幅された標的核酸を検出するための試薬、例えばプローブ等を含むものであってもよい。

【0159】

#### (8) 本発明の組成物

本発明は、前述の本発明の核酸の増幅方法、または本発明の核酸の検出方法に使用される組成物を提供する。該組成物としては、例えば、上記(2)に記載のエンドヌクレアーゼならびに上記(3)に記載のDNAポリメラーゼを含有するものが挙げられる。さらに、増幅反応を行うための成分として、緩衝成分やマグネシウム塩、dNTP等を含んでいてもよい。緩衝成分やその他の添加物としては上記の(4)に記載されたものを使用することができる。

【0160】

特に好適な態様としては、本発明の核酸増幅方法に適した組成で上記の各種成分が含有された組成物を挙げることができ、該組成物は適切な鑄型とキメラオリゴヌクレオチドプライマーを添加するのみで増幅反応を実施することができる。さらに、増幅対象があらかじめ明らかである場合には、当該増幅対象の増幅に適したキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する組成物が好適である。

【0161】

#### (9) 本発明の核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物とその製造方法

DNAチップは、多数の異なる遺伝子あるいはDNAの断片をスライドグラス等の固相担体上の所定の領域あるいは所定の位置に整列させて固定化した核酸固定化物であり、DNAマイクロアレイ(DNAアレイ)とも呼ばれる。DNAチップは、試料より調製した核酸試料、好ましくは標識された核酸試料と接触させてハイブリダイゼーションを行うことにより、核酸試料中に存在する、DNAチップ上の所定の領域に整列させて固定化されたDNAと相補的な配列を有する核酸の存在を調べる目的で使用される。試料中の多数の核酸を一度の操作で検出、定量できることから、DNAチップは遺伝子の発現解析や変異あるいは多型解析を飛躍的に加速させる手段として非常に有用である。二本鎖核酸が所定の領域に整列させて固定化されたDNAチップは適切な変性処理の後にハイブリダイゼー

ション工程に使用されるが、検出しようとする標的核酸に相補的な一本鎖DNAが所定の領域に整列させて固定化されたDNAチップは、標的核酸の検出に特に好適である。

#### 【0162】

上記のように、本発明の方法により所望のDNAを一本鎖の状態を増幅することができる。増幅物の精製方法に限定はないが、イソプロパノール沈殿による精製が好ましい。こうして得られたDNA、特に好ましくは実質的にその相補鎖を含有しない一本鎖のDNAは、DNAチップ上に固定するDNA断片として好適に使用できる。即ち、本発明の方法は、DNAチップ作製において所定の領域に整列させて固定化するDNAを調製する方法として好適に使用できる。こうして得られたDNAを所定の領域に整列させて固定する担体は不溶性のものであれば特に限定はなく、ガラス、プラスチック等で作製された板状の担体の他、ニトロセルロースやナイロン製の膜状の担体が好適に使用される。また、その固定化にあたっては公知の核酸固定化方法が使用できる。上記のDNAはそのまま担体に固定化を行う他、適当なリンカーを介して、または複数分子のDNAをライゲーションさせたうえで固定化してもよい。

#### 【0163】

本発明の方法により増幅されたDNAを所定の領域に整列させて固定化した核酸固定化物、例えばDNAチップを試料より調製された標的核酸を含む可能性のある核酸試料と接触させ、ハイブリダイゼーションを実施することにより、当該核酸固定化物上の核酸とハイブリダイズした標的核酸を検出、定量することができる。特に、本発明の方法により増幅された一本鎖のDNAを所定の領域に整列させて固定化したDNAチップは、従来よりも簡便な操作で、かつ、高感度、高再現性での標的核酸の検出を可能とする。

#### 【0164】

##### (10) 本発明の核酸の大量製造方法

上記のように、本発明の一態様により等温で実施可能な核酸の増幅方法が提供される。該方法は、増幅しようとする核酸の鋳型となる核酸の他、反応に必要な各種成分を混合して等温条件下で反応させることにより、所望の核酸を製造する

ことができる。PCR法では反応混合物の温度を経時的に変化させる必要があるため、反応のスケールは温度制御が可能な容量（通常、 $200\mu\text{l}$ 以下）に限られ、スケールアップは困難である。一方、当該方法にはこのような制約はなく、反応混合物の容量を増加させることにより大量の核酸を製造することが可能である。当該方法は1分子の鋳型から多数の相補鎖分子が合成され、さらにこれらの相補鎖分子を鋳型とした核酸の合成も可能であることから、鋳型ならびにプライマーを適切に設定することにより、所望の核酸を効率よく、大量に製造することができる。さらにまた、当該方法がPCR法のような特殊な装置、頻繁な温度変化を必要としないことは設備、エネルギーのコスト面からも有利であり、工業的な核酸の大量製造方法としても優れている。

## 【0165】

さらに、本発明の製造方法では、前述の（4）で例示したような反応バッファー及びアニーリング溶液の使用により、微量の鋳型核酸からも目的とする核酸配列を増幅し、製造することができる。この場合、使用するエンドヌクレアーゼとDNAポリメラーゼは特に限定はされないが、例えば大腸菌由来のRNase H及びBcaBEST DNAポリメラーゼの組み合わせが好ましい。さらに、上記エンドヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼはともにその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想されるが、その際には増幅産物量の最大を指標にして、該バッファーの組成および酵素の添加量を調整すればよい。

## 【0166】

また、本発明の方法は、上記のDNAチップに固定化するためのDNA断片のような多種類、かつ大量のDNA断片を供給する方法として有用である。すなわち、1つの態様としては、単純な反応工程でDNA断片を大量に得ることができ、別の態様としては限られた種類のプライマーを使用して非常に多種類のDNA断片を得ることができる。後者は、本発明の方法の鋳型となる核酸を公知の核酸増幅方法、例えばPCR法等であらかじめ増幅する工程を組み合わせる実施することができる。例えば、ヌクレイック アシズ リサーチ (Nucleic Acids Research) 第24巻、19号、3778～3783頁（1996）に記載のタグ配列を有するランダムプライマーを使用して核酸を増幅する方法あるいは、ジェノ

ミックス (Genomics) 第13巻、718～725頁 (1992) に記載の縮重プライマー (Degenerate primer) を用いたDOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR) 法に基づき、限られた種類のプライマーを使用してあらゆる種類の鋳型核酸を増幅することができる。さらに、前述のランダムプライマーや縮重プライマーに付加されたタグ配列にあわせて本発明の核酸の増幅方法に使用されるプライマーを設計すれば、上記の工程で作成されたあらゆる鋳型核酸について1もしくは数種類のプライマーで本発明の核酸増幅反応を実施することができる。このように、適切な鋳型核酸の調製工程と本発明の方法を組み合わせれば、多種類のDNA断片を従来よりも安価で、大量に供給することができる。

## 【0167】

核酸を含有する医薬としては、細胞内において有用なポリペプチドを発現させるための二本鎖DNA、目的の遺伝子の発現を抑制するための一本鎖アンチセンスDNA等があり、これらは適切な手段、例えばリポソーム等の遺伝子導入用担体を使用して生体に投与される。本発明の核酸の製造方法は、上記のような医薬用途等の一本鎖、もしくは二本鎖の核酸を大量に製造するための方法として好適である。さらに、本発明の方法では、例えば生体内での分解を抑制するようなdNTPのアナログを含有する核酸を製造することも容易である。

## 【0168】

本発明において増幅されたDNA断片は通常のヌクレオチドにより構成されるため、例えば、増幅されたDNAはその内部の制限酵素部位を用いて適当なベクターにサブクローニングすることができる。さらにRFLPのような制限酵素を用いた処理をすることも問題なくでき、遺伝子検査の分野においても広く利用できる。また、増幅断片中にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を組込んでおけば、増幅断片を鋳型としてRNAを合成し、例えば、合成されたRNAをプローブとして使用可能である。当然ながら、通常のdNTPの代わりに蛍光標識されたdNTPを使用して本発明の核酸増幅方法を実施することにより、蛍光標識されたDNAプローブを作製することができる。

## 【0169】

本発明の核酸の増幅方法の特徴を以下に列挙する。

1. 少ない鋳型量より、大量の核酸を増幅することができる。2種のプライマーを使用した場合には増幅産物は2次関数的に増加する。
  2. 等温でも実施でき、その場合サーマルサイクラーのような装置を必要としない。このため、容易に反応容量をスケールアップすることができる。
  3. 通常、増幅反応は1または2種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーと2種の酵素（DNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼ）で実施される。
  4. 1分子のプライマーより多数のDNA鎖が合成されるため、プライマー量が増幅産物量を制限することがない。さらに、プライマー使用効率が約100%とPCR法に比べて極めて高い。
  5. 一本鎖、二本鎖のDNAを目的に応じ選択的に増幅することができる。
  6. 増幅反応に（ $\alpha$ -S）dNTPのようなdNTPアナログを必要としないため、試薬コストが安価である。また、dNTPアナログを含有しない、天然型の核酸を取得することが可能である。
  7. 核酸複製方法と組み合わせることにより、安価で大量のDNA増幅断片を供給することができる。
  8. 本発明の検出方法は、従来法と比較して同等以上の検出感度を有する。さらに、同じ検出感度であれば、従来法よりも短時間で検出することができる。
  9. マイクロチップ、ナノチップにおける核酸の増幅、検出の自動化、微量化、高集積化に適した方法である。
- 以上のように、本発明の方法は遺伝子の検出、工業的スケールでの核酸製造のいずれにも適した方法である。

【0170】

【実施例】

本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例によって限定されるものではない。

【0171】

参考例1 好熱菌バチルス カルドテナックス由来のRNase Hの調製  
トリプトン（ディフコラボラトリーズ社製）0.2%、酵母エキス（ディフコ  
ラボラトリーズ社製）1.5%を含む培地（pH6.5）100mlにバチルス



カルドテナックスYT-G株 (*Bacillus caldotenax* YT-G、ドイッチェ ザム  
ルンク フォン ミクロオルガニズメンより購入: DSM406) を植菌し、6  
0℃で140分間振とう培養し、この培養液を前培養液とした。ついで、同組成  
の培地3Lに前培養液30mlを接種し、通気量2.5L/分、攪拌数250回  
転/分、温度60℃で5時間培養した。

培養液を遠心分離 (5000×g、15分) し、集菌した。湿菌重量402g  
の菌体を10mM メルカプトエタノール、0.5M NaCl、1mM EDTA、20μM PAPMSFを含む50mM トリス-HCl緩衝液 (pH7.5) 1000mlに懸濁し、MINI-Lab (APV GAULIN/RAN  
NIE社製) にて菌体を破碎後、遠心分離で細胞残渣を除き、上清を回収した。

#### 【0172】

得られた上清液に終濃度が0.1%となるようにポリエチレンジイミン溶液を加  
え、攪拌後、1時間放置し、遠心分離にて上清を回収した。この上清液に50%  
飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、遠心分離で得られた沈殿を10mM  
メルカプトエタノール、0.1mM EDTA、50mM NaCl、10%  
グリセロールを含む20mM トリス-HCl緩衝液 (pH7.5) に溶解し、  
同緩衝液に対して透析した。同緩衝液で平衡化した280mlのDE52カラム  
(ワットマン社製) に透析試料を負荷し、非吸着画分を集めた。

さらに平衡化に用いた緩衝液420mlで洗浄し、洗浄画分を集めた。DE52  
カラムクロマトグラフィーでの非吸着画分と洗浄画分を混合し、10mM メ  
ルカプトエタノール、0.1mM EDTA、50mM NaCl、10%グリ  
セロールを含む20mM トリス-HCl緩衝液 (pH7.5) で平衡化した2  
40mlのP-11カラム (ワットマン社製) に負荷した。その後、0~0.5  
M NaClを含む平衡化緩衝液で溶出させた。

得られた活性画分を透析チューブに入れ、固体のポリエチレングリコール20  
000上に置き、4℃で脱水濃縮した。次に、5mM メルカプトエタノール、  
0.5mM EDTA、30mM NaCl、50%グリセロールを含む25m  
M トリス-HCl緩衝液 (pH7.5) で平衡化した300mlのSuper  
dex G-200カラム (アマシャム ファルマシア バイオテック社製) に、

この酵素濃縮液を負荷した。平衡化に用いた緩衝液で溶出させ、活性画分を得た。10 mM メルカプトエタノール、0.1 mM EDTA、50 mM NaCl、10%グリセロールを含む20 mM トリス-HCl緩衝液(pH 7.5)で平衡化した15 mlのHeparin-Sepharoseカラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に活性画分を負荷し、0~0.5 M NaClを含む平衡化緩衝液で溶出させた。

得られた活性画分を10 mM メルカプトエタノール、0.1 mM EDTA、50 mM NaCl、10%グリセロールを含む20 mM トリス-HCl緩衝液(pH 7.5)で平衡化した5 mlのHitrap-SPカラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に負荷し、0~0.5 M NaClを含む平衡化緩衝液で溶出させた。得られた活性画分を、再度5 mMメルカプトエタノール、0.5 mM EDTA、30 mM NaCl、50%グリセロールを含む25 mM トリス-HCl緩衝液(pH 7.5)で平衡化した300 mlのSuperdex G-200カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に負荷し、得られた活性画分をRNase H標品(酵素液)とした。

### 【0173】

耐熱性RNase H活性は、次の方法により測定した。

ポリ(rA)及びポリ(dT) (ともにアマシャム ファルマシア バイオテク社製) 1 mgをそれぞれ1 mM EDTAを含む40 mM トリス-HCl (pH 7.7) 1 mlに溶解し、ポリ(rA)溶液及びポリ(dT)溶液を調製した。

次に、4 mM  $MgCl_2$ 、1 mM DTT、0.003% BSA、4%グリセロールを含む40 mM トリス-HCl (pH 7.7) に、終濃度20  $\mu g/ml$ となるポリ(rA)溶液、終濃度30  $\mu g/ml$ となるポリ(dT)溶液を加え、37℃で10分間反応後、4℃に冷却し、ポリ(rA)-ポリ(dT)溶液を調製した。

ポリ(rA)-ポリ(dT)溶液100  $\mu l$ に酵素液1  $\mu l$ を加え、40℃で10分間反応させ、0.5 M EDTA 10  $\mu l$ を加えて反応を停止させた後、260 nmの吸光度を測定した。対照として、上記反応液に0.5 M EDT

A 10  $\mu$ l を加えた後、40℃で10分間反応させ、吸光度を測定した。その後、EDTA非存在下で反応させ求めた吸光度から対照の吸光度を引いた値（吸光度差）を求めた。すなわち、酵素反応によってポリ（rA）-ポリ（dT）ハイブリッドから遊離したヌクレオチドの濃度を吸光度差から求めた。RNase Hの1単位は、1nmolのリボヌクレオチドが遊離したのに相当するA<sub>260</sub>を10分間に増加させる酵素量とし、下記の式に従って算出した。

$$\text{単位 (unit)} = [\text{吸光度差} \times \text{反応液量 (ml)}] / 0.0152$$

【0174】

参考例2 バチルス カルドテナックス RNase HII 遺伝子のクローニング

(1) バチルス カルドテナックス ゲノムDNAの調製

バチルス カルドテナックス YT-G株 (DSM406) を60mlのLB培地（1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、pH7.2）に植菌し、65℃、20時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し集菌した。得られた菌体を2mlの25%ショ糖、50mM トリス-HCl（pH8.0）に懸濁し、0.2mlの10mg/ml塩化リゾチーム（ナカライテスク社製）水溶液を加えて、20℃で1時間反応させた。反応終了後、この反応液に12mlの150mM NaCl、1mM EDTA、20mM トリス-HCl（pH8.0）、0.1mlの20mg/mlプロテイナーゼK（宝酒造社製）及び1mlの10%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37℃で1時間保温した。

次いで2.1mlの5M NaClと2mlのCTAB-NaCl溶液〔10%セチルトリメチルアンモニウムブロミド（ナカライテスク社製）、0.7M NaCl〕を加えてよく混合し、65℃で10分間保温した。これに等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液（24:1、v/v）を加えて10分間緩やかに混合した後、10分間遠心（10000×g）を行った。遠心終了後、得られた上清に等量の100mM トリス-HCl（pH8.0）飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液（25:24:1、v/v）を加えて10分間緩やかに混合した後、更に10分間遠心（10000×g）を行

った。遠心終了後、得られた上清に0.6容の2-プロパノールを加え、生じた糸状の沈殿をガラス棒で巻き取った。これを70%エタノール水溶液で洗浄し、風乾した後に0.5mlのTE緩衝液に溶解してゲノムDNA溶液を得た。

## 【0175】

## (2) RNase HII 遺伝子中央部のクローニング

様々な生物由来のRNase HIIのアミノ酸配列間で保存されている部分のうち、モチーフIとモチーフIII [バイオケミストリー(Biochemistry)、第38巻、第605-608頁(1999)] をもとにして配列表の配列番号1及び2記載のオリゴヌクレオチドBsuiI-3とオリゴヌクレオチドBsuiI-6を合成した。

## 【0176】

上記参考例2-(1)で調製したバチルス カルドテナックス ゲノムDNA溶液1 $\mu$ lを鋳型にして、100pmolのBsuiI-3及び100pmolのBsuiI-6をプライマーに用い、100 $\mu$ lの容量でPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラ タック ポリメラーゼ(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94℃で30秒、45℃で30秒、72℃で1分を1サイクルとして、50サイクル行った。反応終了後、反応液にフェノール処理とエタノール沈殿を行ってDNAを精製した。得られたDNAをT4 DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を用いてDNAの末端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅された約0.4kbのDNA断片をゲルから回収した。得られた約0.4kb DNA断片を、SmaI(宝酒造社製)で消化したpUC119(宝酒造社製)にT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。この形質転換体を培養し、約0.4kbのDNAが挿入されたプラスミド21-12を得た。

## 【0177】

## (3) RNase II 遺伝子上流部分のクローニング

上記参考例2-(2)で得たプラスミド21-12の約0.4kbの挿入断片の塩基配列を決定し、それをもとに配列表の配列番号3及び4記載のオリゴヌクレオチドRNII-S1とオリゴヌクレオチドRNII-S2を合成した。

参考例2-(1)で調製したバチルス カルドテナックス ゲノムDNAをBamHI (宝酒造社製)で消化し、得られたBamHI消化物とSau3AIカセット (宝酒造社製)をT4 DNAリガーゼで連結し、これを鋳型、RNII-S2を1次PCRのプライマー、RNII-S1を2次PCRのプライマーとして、タカラ LA PCR イン ビトロ クローニング キット (宝酒造社製)に添付のプロトコールに従って操作を行った。フェノール処理とエタノール沈殿によって2次PCR液からDNAを精製し、T4 DNAポリメラーゼを用いてこのDNAの末端を平滑化し、その後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅した約1.5kbのDNA断片をゲルから回収した。得られた約1.5kbのDNA断片を、SmaIで消化したpUC119にT4 DNAリガーゼを用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。

この形質転換体を培養し、約1.5kbのDNAが挿入されたプラスミドB25N16を得た。

#### 【0178】

##### (4) RNaseII遺伝子全域のクローニング

参考例2-(3)で決定したプラスミド21-12の約0.4kbの挿入断片の塩基配列をもとに配列表の配列番号5及び6記載のオリゴヌクレオチドRNII-S5とオリゴヌクレオチドRNII-S6を合成した。

参考例2-(2)で調製したプラスミド21-12を鋳型に、RNII-S5とRNII-S6をプライマーとしてPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラ EXタック ポリメラーゼ (宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で30秒を1サイクルとして、25サイクル行った。反応終了後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅した約0.3kbのDNA断片をゲルから回収した。得られた約0.3kbのDNA断片をDIGハイプライム (ロシュ ダイアグノスティックス社製)でジゴキシゲニン標識した。

#### 【0179】

上記のジゴキシゲニン標識DNAをプローブとして、参考例2-(1)で調製したバチルス カルドテナックス ゲノムDNAをHindIII (宝酒造社製)

）、*Sac*I（宝酒造社製）による消化、及び*Hind*IIIと*Sac*Iの2重消化をそれぞれ行い、得られた消化物とサザンハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーションと検出はDIGルミネッセント デテクションキット（ロシュ ダイアグノスティックス社製）を添付のプロトコールに従って用いた。

その結果、*Hind*III消化では約4.5 kb断片、*Sac*I消化では約5.8 kb、*Hind*IIIと*Sac*Iの2重消化では約1.3 kbのDNA断片がプローブとハイブリダイズした。

#### 【0180】

上記結果に基づき、バチルス カルドテナックス ゲノムDNAを*Hind*III消化してアガロースゲル電気泳動を行い、約4.5 kb付近のDNAをゲルから回収した。得られたDNA断片を*Sac*Iで消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、1.3 kb付近のDNAをゲルから回収した。このDNAを、*Hind*IIIと*Sac*Iで消化したpUC19（宝酒造社製）にT4 DNAリガーゼを用いて連結し、大腸菌HB101を形質転換した。

得られた形質転換体をハイボンドN（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）にレプリカし、上記のジゴキシゲニン標識プローブを用いて、常法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行った。こうして得られた陽性クローンからプラスミドpRHB1を調製した。

次に、pRHB1に挿入されたDNAの塩基配列を決定し、それから予想されるアミノ酸配列を枯草菌のRNase HIIのアミノ酸配列と比較したところ、pRHB1中のDNAは開始コドンから約40 bpを欠いていることが予想された。そこで以下のようにして完全長のRNase H遺伝子を構築した。

#### 【0181】

参考例2-（3）で調製したB25N16を*Hind*IIIで消化し、アガロースゲル電気泳動を行った後、約160 bpのDNA断片をゲルから回収した。得られた約160 bpのDNA断片を、上記で調製したpRHB1の*Hind*III消化物にT4 DNAリガーゼを用いて連結し、大腸菌HB101を形質転換

換した。得られた形質転換体からプラスミドを調製した。

次に、予想される開始コドン周辺の塩基配列をもとにして、配列表の配列番号7記載のオリゴヌクレオチドRNII-Ndeを合成し、上記で得られた形質転換体から調製したプラスミドを鋳型とし、RNII-NdeとRNII-S6をプライマーとして、PCRを行った。この時に約0.7kbのDNA断片が増幅するプラスミドを選択し、このプラスミドをpRHB11とした。

#### 【0182】

こうして得られたプラスミドpRHB11に挿入されたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果を解析したところ、RNaseHIIをコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。この塩基配列を配列表の配列番号8に示す。また、該塩基配列から推定されるRNaseHIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号9に示す。

#### 【0183】

なお、プラスミドpRHB11で形質転換された大腸菌HB101は、*Escherichia coli* JM109/pRHB11と命名、表示され、平成12年9月5日より工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-18021として寄託されている。

#### 【0184】

##### (5) バチルス カルドテナックス RNaseHII遺伝子の発現

pRHB11又はpRHB1で形質転換された大腸菌HB101を100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む5mlのLB培地に植菌し、37℃で1晩振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を0.5mlのTE緩衝液に懸濁して超音波破碎し、遠心分離によって上清を得、これを菌体粗抽出液とした。

10mM トリス-HCl (pH8.0)、1mM ジチオスレイトール (ナカライテスク社製)、0.003%ウシ血清アルブミン (フラクシオンV、シグマ社製)、4%グリセロール、20 $\mu$ g/mlポリ(dT) (アマシャム ファルマシア バイオテク社製)、30 $\mu$ g/mlポリ(rA) (アマシャム ファルマシア バイオテク社製)を混合し、37℃で10分間保温した。これをRNaseH活性を測定するための基質液として使用した。

100  $\mu$ lの基質液に1  $\mu$ lの1M  $MnCl_2$ を加えて40℃で保温し、これに10  $\mu$ lの10倍希釈した菌体粗抽出液を加えて反応を開始した。40℃で30分間反応を行った後、10  $\mu$ lの0.5M EDTAを加えて反応を停止し、260nmにおける吸光度を測定した。

その結果、pRHB1を保持する大腸菌HB101から調製した菌体粗抽出液で反応させたときに比べて、pRHB11を保持する大腸菌HB101から調製した菌体粗抽出液で反応させたときに明らかに260nmにおける吸光度の値が高かった。よって、pRHB11はRNaseH遺伝子を含んでおり、このpRHB11を保持する大腸菌でRNaseH活性を発現することが明らかになった。

#### 【0185】

##### (6) 精製RNaseHII標品の調製

参考例2-(4)で得られたpRHB11で形質転換された大腸菌HB101を100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む1LのLB培地に植菌し、37℃で16時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を52.3mlのソニケーションバッファー〔50mM トリス-HCl (pH8.0)、2mM 2-メルカプトエタノール、10%グリセロール、2mM フェニルメタンスルフォニルフルオリド〕に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を60℃、15分間の熱処理にかけた。その後、再度12000rpmで10分間の遠心分離を行い、上清を集め、50.0mlの熱処理上清液を得た。

#### 【0186】

この溶液をバッファーC〔50mM トリス-HCl (pH8.0)、2mM 2-メルカプトエタノール、10%グリセロール〕で平衡化したRESOURCE Qカラム（アマシャム ファルマシア バイオテック社製）に供し、FPLCシステム（アマシャム ファルマシア バイオテック社製）を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNaseHIIはRESOURCE Qカラムを素通りした。素通りしたRNaseHII画分51mlをバッファーCで平衡化したRESOURCE Sカラム（アマシャム ファルマシア バイオテック



社製)に供し、FPLCシステムを用いて0~500 mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、約240 mM NaClのところに溶出されたRNase II画分を得た。このRNase II画分3.0 mlを2回に分けて50 mM NaClを含むバッファーCで平衡化したPD-10カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に供し、得られた溶出液7.0 mlを50 mM NaClを含むバッファーCで平衡化したHiTrap-heparinカラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に供し、FPLCシステムを用いて50~550 mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、約310 mM NaClのところに溶出されたRNase II画分を得た。このRNase II画分4.4 mlをセントリコン-10(アミコン社製)を用いた限外ろ過により濃縮し、280  $\mu$ lの濃縮液を100 mM NaCl、0.1 mM EDTAを含む50 mM トリス-HCl (pH 8.0)で平衡化したSuperdex 200ゲルろ過カラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、RNase HIIは、35キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、RNase HIIが1量体として存在する場合に相当する。

こうして溶出されたRNase HIIをBcaRNase HII標品とした。

#### 【0187】

上記で得られたBcaRNase HII標品を用いて、以下の方法により酵素活性を測定した。

BcaRNase HII標品1  $\mu$ lに40℃であらかじめインキュベーションした反応液[20 mM ヘプス-水酸化カリウム (pH 7.8)、0.01%牛血清アルブミン(宝酒造社製)、1%ジメチルスルホキシド、10 mM 塩化マンガン、20  $\mu$ g/mlポリ(dT)(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)、30  $\mu$ g/mlポリ(rA)(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)]100  $\mu$ lを添加し、40℃で10分間反応させた後、0.5 M EDTA (pH 8.0)10  $\mu$ lで反応を停止し、260 nmの吸収を測定した。

その結果、Bca RNase HII標品にRNase H活性が認められた。

#### 【0188】

### 参考例3 バチルス カルドテナックス RNaseHIII遺伝子のクローニング

#### (1) RNaseHIII遺伝子断片のクローニング

バチルス サブチリスのRNaseHIIIのアミノ酸配列〔バイオケミストリー: Biochemistry、第38巻、第605-608頁(1999)〕について、他の生物由来のRNaseHIIIのアミノ酸配列とのホモロジーを調べ、これらの間でよく保存されている領域のアミノ酸配列からRNaseHIIIをコードする遺伝子を探索するための配列表の配列番号10~13記載のプライマーBs uIII-1、Bs uIII-3、Bs uIII-6、Bs uIII-8を合成した。

【0189】

参考例2-(1)で調製したバチルス カルドテナックス ゲノムDNA 200ngを鋳型にし、100pmolのBs uIII-1及び100pmolのBs uIII-8をプライマーにして、50 $\mu$ lの容量で1回目のPCRを行った。更にその反応液1 $\mu$ lを鋳型として100pmolのBs uIII-3及び100pmolのBs uIII-6をプライマーに用いて100 $\mu$ lの容量で2回目のPCRを行った。この2回のPCRでのDNAポリメラーゼには、タカラ タック ポリメラーゼ(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、1回目のPCRは94℃で30秒、45℃で30秒、72℃で1分を1サイクルとして、25サイクル行い、2回目は30サイクル行なった。

増幅して得られた約450bpのDNA断片をT4 DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を用いて末端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅された約450bpのDNA断片を回収した。得られた約450bpのDNA断片を、SmaI(宝酒造社製)で消化したpUC119(宝酒造社製)にT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)を用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。該形質転換体を培養し、約450bpのDNA断片が挿入されたプラスミドpBCA3204を得た。

【0190】

#### (2) サザンハイブリダイゼーション法によるRNaseHIII遺伝子のクロ

## ーニング

参考例3-(1)で得られたpBCA3204に挿入されたDNA断片の塩基配列を決定し、得られた配列もとに、配列表の配列番号14及び15記載のプライマーRNIII-S3及びBcaRNIII-3を合成した。このプライマーRNIII-S3及びBcaRNIII-3を用いて、pBCA3204を鋳型にし、100 $\mu$ lの容量でPCRを行なった。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラZタック（宝酒造社製）を添付のプロトコールに従って用い、PCRは98℃で0秒、55℃で0秒、72℃で20秒を1サイクルとして、30サイクル行なった。反応終了後、フェノールクロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行った。そして、アガロースゲル電気泳動を行い、約0.4kbのDNA断片をゲルから回収した。得られた約0.4kbのDNA断片をDIG DNA標識キット（ベリンガー マンハイム社製）で標識し、プローブを調製した。

## 【0191】

参考例2-(1)で調製したバチルス カルドテナックス ゲノムDNA 20 $\mu$ gをBamHI、EcoRI、HindIII、PstI、XbaI（すべて宝酒造社製）で、それぞれ完全消化した後、その半分量をアガロース電気泳動した。アガロースゲルからDNAを0.4N 水酸化ナトリウムをもちいてナイロンメンブレンにトランスファーした後、120℃で30分間固定した。次に、メンブレンを30mlハイブリダイゼーションバッファー〔43.4g/L 塩化ナトリウム、17.6g/L クエン酸ナトリウム、1%ブロッキング剤（ベリンガー マンハイム社製）、0.1%N-ラウロイルサルコシン、0.02%ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）〕の入ったシールドバック中で、60℃、4時間プレインキュベーションした後、プローブを含むハイブリダイゼーションバッファー5mlの入ったシールドバック中で、60℃、16時間インキュベーションした。

次に、メンブレンを50mlの0.1%SDSをふくむ2×SSC（17.5g/L NaCl、8.8g/L クエン酸ナトリウム）中、室温で2回、50mlの0.1%SDSを含む0.5×SSC（4.3g/L 塩化ナトリウム、1.9g/L クエン酸ナトリウム）中、45℃で2回洗浄した後、DIG核酸

検出キット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて、プローブと相補的な配列を持った約8 kbのEcoRI断片、約4.5 kbのPstI断片、約1 kbのHindIII断片を検出した。

#### 【0192】

PstIで完全消化したバチルス カルドテナックス ゲノムDNAの残り半分量をアガロース電気泳動し、約4.5 kbのPstI断片をゲルから回収した。次に、このDNA断片と、PstI消化した後アルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）を用いて脱リン酸化したプラスミドベクターpTV119Nとをライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換した。

プライマーRNIII-S3及びBcaRNIII-3を用いて、コロニーを鋳型にし、50 µlの容量でPCRを行ない、RNaseHIII遺伝子を持つと考えられるコロニーを選択した。このPCRには、タカラZタック（宝酒造社製）を添付のプロトコールに従って用い、PCRは98℃で0秒、55℃で0秒、72℃で20秒を1サイクルとして、30サイクル行った。この結果、No. 88のコロニーに目的の遺伝子が含まれていることがわかった。

次に、このNo. 88のコロニーからプラスミドを調製し、これを鋳型にプライマーRN-N（宝酒造社製）およびBcaRNIII-3又はプライマーM4（宝酒造社製）及びRNIII-S3を用いてPCRを行い、RNaseHIII遺伝子の全長が含まれているかどうかを調べた。その結果、RNaseHIIIの全長が含まれていることが分かり、このプラスミドをpBCA3P88とした。

#### 【0193】

##### (3) RNaseHIII遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

参考例3-(2)で得られたプラスミドpBCA3P88の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNaseHIIIのN末端アミノ酸配列を有するオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号16に、また、該塩基配列から推定されるRNaseHIIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号17にそれ

ぞれ示す。

【0194】

(4) RNaseHIIIを発現させるためのプラスミドの構築

参考例3-(2)に記載のプラスミドpBCA3P88を鋳型にし、上記得られたRNaseHIIIのオープンリーディングフレームの周辺の配列を参考として設定した配列表の配列番号18記載のBcaRNIIIInde及びM13プライマーM4(宝酒造社製)を用いて、100 $\mu$ lの容量でPCRを行なった。PCRでのDNAポリメラーゼはパイロベストDNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で3分を1サイクルとして、30サイクル行った。この結果増幅した約4kbのDNA断片をNdeI(宝酒造社製)で消化し、アガロース電気泳動を行い、約1.4kbのNdeI断片をゲルから回収した。得られた約1.4kbのDNA断片を、NdeI消化した後アルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)を用いて脱リン酸化したpTV119Nd(pTV119NのNcoIサイトをNdeIサイトに変換したもの)とライゲーションを行い、大腸菌JM109を形質転換した。

【0195】

次に、NdeI断片中のRNaseHIII遺伝子がpTV119Ndベクターのlacプロモーター下流につながったプラスミドをスクリーニングするためコロニーを鋳型にし、プライマーRN-N(宝酒造社製)およびBcaRNIII-3を用いて、50 $\mu$ lの容量でPCRを行ない、RNaseHIII遺伝子を持つと考えられるコロニーを選択した。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラZタック(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは98℃で0秒、55℃で0秒、72℃で20秒を1サイクルとして、30サイクル行った。この結果、No. 2のコロニーがNdeI断片中のRNaseHIII遺伝子がpTV119Ndベクターのlacプロモーター下流につながったプラスミドであることが分かり、このプラスミドをpBCA3Nd2とした。

さらに該プラスミド中の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法で確認したところ、開始コドンでGTGからATGに変換したこと以外、PCRに起因する

変異のないことを確認した。

【0196】

なお、プラスミド pBCA3Nd2 で形質転換された大腸菌 JM109 は、*Escherichia coli* JM109/pBCA3Nd2 と命名、表示され、平成12年9月5日より工業技術院 c に受託番号 FERM P-18019 として寄託されている。

【0197】

(5) 精製 RNase HIII 標品の調製

参考例3-(4)で得られた pBCA3Nd2 で形質転換された大腸菌 JM109 を  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む 2 L の LB 培地に植菌し、 $37^\circ\text{C}$  で 16 時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を 39.6 ml のソニケーションバッファー [ $50 \text{ mM}$  トリス-HCl ( $\text{pH} 8.0$ )、 $1 \text{ mM}$  EDTA、 $2 \text{ mM}$  フェニルメタンスルフォニルフルオリド] に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を  $12000 \text{ rpm}$  で 10 分間の遠心分離を行い、得られた上清を  $60^\circ\text{C}$ 、15 分間の熱処理にかけた。その後、再度  $12000 \text{ rpm}$  で 10 分間の遠心分離を行い、上清を集め、39.8 ml の熱処理上清液を得た。

【0198】

この熱処理上清液をバッファー A [ $50 \text{ mM}$  トリス-HCl ( $\text{pH} 8.0$ )、 $1 \text{ mM}$  EDTA] で平衡化した RESOURCE Q カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、FPLC システム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNase HIII は RESOURCE Q カラムを素通りした。

素通りした RNase HIII 画分 45 ml をバッファー B [ $50 \text{ mM}$  トリス-HCl ( $\text{pH} 7.0$ )、 $1 \text{ mM}$  EDTA] 2 L を外液として、2 時間の透析を 3 回行なった。透析後の酵素液 55.8 ml をバッファー B で平衡化した RESOURCE S カラム (ファルマシア ファルマシア バイオテク社製) に供し、FPLC システムを用いて  $0 \sim 500 \text{ mM}$  NaCl 直線濃度勾配により溶出し、約  $105 \text{ mM}$  NaCl のところに溶出された RNase HIII 画分を得た。

この画分7. 0mlにNaCl濃度が150mMになるように1M NaClを含むバッファーBを添加し、150mM NaClを含むバッファーBで平衡化したHiTrap-heparinカラム（アマシャム ファルマシア バイオテック社製）に供した。その結果、RNaseHIIIはHiTrap-heparinカラムを素通りした。

素通りしたRNaseHIII画分7. 5mlをセントリコン-10（アミコン社製）を用いた限外ろ過により濃縮し、190 $\mu$ lの濃縮液を100mM NaCl、0. 1mM EDTAを含む50mM トリス-HCl（pH7. 0）で平衡化したSuperdex200ゲルろ過カラム（アマシャム ファルマシア バイオテック社製）に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、RNaseHIIIは、33キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、RNaseHIIIが1量体として存在する場合に相当する。

こうして溶出されたRNaseHIIIをBca RNaseHIII標品とした。

#### 【0199】

上記で得られたBca RNaseHIII標品を用いて、以下の方法により酵素活性を測定した。

Bca RNaseHIII標品1 $\mu$ lに40℃であらかじめインキュベーションした反応液〔20mM ヘプス-水酸化カリウム（pH7. 8）、0. 01% 牛血清アルブミン（宝酒造社製）、1%ジメチルスルホキシド、4mM 酢酸マグネシウム、20 $\mu$ g/mlポリ（dT）（アマシャム ファルマシア バイオテック社製）、30 $\mu$ g/mlポリ（rA）（アマシャム ファルマシア バイオテック社製）〕100 $\mu$ lを添加し、40℃で10分間反応させた後、10 $\mu$ l 0. 5M EDTA（pH8. 0）で反応を停止し、260nmの吸収を測定した。その結果、Bca RNaseHIII標品にRNaseH活性が認められた。

#### 【0200】

参考例4 ピロコッカス フリオサスのRNaseHIII遺伝子のクローニング

## (1) ピロコッカス フリオサス ゲノムDNAの調製

トリプトン (ディフコラボラトリーズ社製) 1%、酵母エキス (ディフコラボラトリーズ社製) 0.5%、可溶性でんぷん (ナカライテスク社製) 1%、ジャマリンS・ソリッド (ジャマリンラボラトリー社製) 3.5%、ジャマリンS・リキッド (ジャマリンラボラトリー社製) 0.5%、 $\text{MgSO}_4$  0.003%、 $\text{NaCl}$  0.001%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0001%、 $\text{CoSO}_4$  0.0001%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0001%、 $\text{ZnSO}_4$  0.0001%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.1 ppm、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  0.1 ppm、 $\text{H}_3\text{BO}_4$  0.1 ppm、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 ppm、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.25 ppmの組成の培地2Lを2L容のメジウムボトルにいれ、120℃、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹き込み、溶存酸素を除去し、これにピロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*、ドイツェ ザムルンク フォン ミクロオルガニズメンより購入: DSM3638) を接種して、95℃、16時間静置培養した後、遠心分離によって菌体を得た。

次に、得られた菌体を4mlの25%ショ糖、50mM トリス-HCl (pH8.0) に懸濁し、0.4mlの10mg/ml塩化リゾチーム (ナカライテスク社製) 水溶液を加えて、20℃で1時間反応させた。反応終了後、この反応液に24mlの150mM  $\text{NaCl}$ 、1mM EDTA、20mM トリス-HCl (pH8.0)、0.2mlの20mg/mlプロテイナーゼK (宝酒造社製) 及び2mlの10%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37℃で1時間保温した。反応終了後、フェノールクロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行い、約1mgのゲノムDNAを調製した。

【0201】

## (2) RNase HII 遺伝子のクローニング

ピロコッカス ホリコシ (*Pyrococcus horikoshii*) の全ゲノム配列が公開されており [DNA リサーチ (DNA Reseach), 第5巻、第55-76頁 (1998)]、RNase HII のホモログをコードする遺伝子 (PH1650) が1つ存在することが明らかになっている (配列表の配列番号19、日本国 通商産業省 製品評価センター ホームページ: <http://www/nite.go.jp/>)。



そこで、このPH1650遺伝子と一部公開されているピロコッカス フリオサスのゲノム配列 (University of Utah, Utah Genome Centerホームページ: <http://www.genome.utah.edu/sequence.html>) でホモロジー検索をおこなった。その結果、非常にホモロジーの高い配列が見つかった。得られた配列をもとにプライマー1650Nde (配列番号20) 及び1650Bam (配列番号21) を合成した。

参考例4-(1) で得たピロコッカス フリオサスDNA 200ngを鋳型にして、20pmolの1650Nde及び20pmolの1650Bamをプライマーに用い、100 $\mu$ lの容量でPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラExタック (宝酒造社製) を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分を1サイクルとし、30サイクル行った。増幅した約0.7kbのDNA断片をNde I 及びBamH I (ともに宝酒造社製) で消化し、得られたDNA断片をプラスミドベクターpET3a (ノバジェン社製) のNde I 及びBamH I 間に組込んだプラスミドpPFU220を作製した。

#### 【0202】

(3) RNaseHII 遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

参考例4-(2) で得られたpPFU220の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNaseHIIをコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号22に示す。また、該塩基配列から推定されるRNaseHIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号23に示す。

#### 【0203】

なお、プラスミドpPFU220で形質転換された大腸菌JM109は、Escherichia coli JM109/pPFU220と命名、表示され、平成12年9月5日より工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-18020として寄託されている。

## 【0204】

## (4) 精製 RNase HII 標品の調製

参考例 4-(2) で得られた pPFU220 で大腸菌 HMS174 (DE3) (ノバジェン社製) を形質転換し、得られた pPFU220 を含む大腸菌 HMS174 (DE3) を  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む 2 L の LB 培地に植菌し、 $37^\circ\text{C}$  で 16 時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を  $66.0 \text{ ml}$  のソニケーションバッファー [ $50 \text{ mM}$  トリス-HCl ( $\text{pH} 8.0$ )、 $1 \text{ mM}$  EDTA、 $2 \text{ mM}$  フェニルメタンスルフォニルフルオリド] に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を  $12000 \text{ rpm}$  で 10 分間の遠心分離を行い、得られた上清を  $60^\circ\text{C}$ 、15 分間の熱処理にかけた。その後、再度  $12000 \text{ rpm}$  で 10 分の遠心分離を行い、上清を集め、 $61.5 \text{ ml}$  の熱処理上清液を得た。

## 【0205】

この熱処理上清液をバッファー A [ $50 \text{ mM}$  トリス-HCl ( $\text{pH} 8.0$ )、 $1 \text{ mM}$  EDTA] で平衡化した RESOURCE Q カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、FPLC システム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNase HII は RESOURCE Q カラムを素通りした。

素通りした RNase HII 画分  $60.0 \text{ ml}$  をバッファー A で平衡化した RESOURCE S カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、FPLC システムを用いて  $0 \sim 500 \text{ mM}$  NaCl 直線濃度勾配により溶出し、約  $150 \text{ mM}$  NaCl のところに溶出された RNase HII 画分を得た。この RNase HII 画分  $2.0 \text{ ml}$  をセントリコン-10 (アミコン社製) を用いた限外ろ過により濃縮し、 $250 \mu\text{l}$  の濃縮液を  $100 \text{ mM}$  NaCl、 $0.1 \text{ mM}$  EDTA を含む  $50 \text{ mM}$  トリス-HCl ( $\text{pH} 8.0$ ) で平衡化した Superdex 200 ゲルろ過カラム (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、RNase HII は、 $17$  キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、RNase HII が 1 量体として存在する場合に相当する。

こうして溶出されたRNase HIIをPfu RNase HII標品とした。

【0206】

上記で得られたPfu RNase HII標品を用いて、参考例3-(5)に記載の方法により酵素活性を測定した結果、Pfu RNase HII標品にRNase H活性が認められた。

【0207】

参考例5 サーモトガ マリティマ RNase HII遺伝子のクローニング

(1) サーモトガ マリティマ ゲノムDNAの調製

トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、可溶性でんぷん 1%、ジャマリン S・ソリッド 3.5%、ジャマリン S・リキッド 0.5%、MgSO<sub>4</sub> 0.003%、NaCl 0.001%、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0001%、CoSO<sub>4</sub> 0.0001%、CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0001%、ZnSO<sub>4</sub> 0.0001%、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.1ppm、KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.1ppm、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1ppm、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1ppm、NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.25ppmの組成の培地2Lを2L容のメディウムボトルにいれ、120℃、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹き込み、溶存酸素を除去し、これにサーモトガ マリティマ (*Thermotoga maritima*、ドイツ ザムルンク フォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルツレン GmbHより購入: DSM3109) を接種して、85℃、16時間静置培養した。

次に、遠心分離によって培地300ml相当分の菌体を集め、3mlのTE緩衝液〔10mM トリス-HCl (pH7.5)、1mM EDTA〕に懸濁し、150μlの10%ラウリル硫酸ナトリウム (ナカライテスク社製) 水溶液及び15μlの20mg/mlプロテイナーゼK (宝酒造社製) を加えて37℃で1時間保温した。反応終了後、0.5mlの5M NaClを加えてよく混合した後、0.4mlのCTAB-NaCl溶液〔10%セチルトリメチルアンモニウムブロミド (ナカライテスク社製)、0.7M NaCl〕を加えてよく混合し、65℃で10分間保温した。これに1.5mlのクロロホルム/イソアミルアルコール混合液 (24:1、v/v) を加えて10分間緩やかに混合した後、

5分間遠心 ( $20000 \times g$ ) を行った。遠心終了後、得られた上清に等量の  $100 \text{ mM}$  トリス-HCl ( $\text{pH } 8.0$ ) 飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混合液 ( $25:24:1$ ,  $v/v$ ) を加えて10分間緩やかに混合した後、更に5分間遠心 ( $20000 \times g$ ) を行った。遠心終了後、得られた上清に  $0.6$  容の2-プロパノールを加え、で5分間遠心 ( $10000 \times g$ ) して得られた沈殿を、 $70\%$  エタノール水溶液で洗浄し、風乾した後に  $200 \mu\text{l}$  のTEに溶解してゲノムDNA溶液を得た。

## 【0208】

## (2) RNaseHII遺伝子のクローニング

サーモトガ マリティマ ゲノムDNAを鋳型としたPCRを行うことによりRNaseHII遺伝子を含む増幅DNA断片を得るため、サーモトガ マリティマ ゲノムDNAの塩基配列 (<http://www.tigr.org/tdb/CMR/btm/htmls/SplashPage.html>) のうちRNaseHII遺伝子と同定されている部分の塩基配列をもとにして、配列表の配列番号24～27記載のオリゴヌクレオチド915-F1、915-F2、915-R1及び915-R2を合成した。

## 【0209】

上記参考例5-(1)で調製したサーモトガ マリティマ ゲノムDNAを鋳型として、915-F1と915-R1、915-F1と915-R2、915-F2と915-R1又は915-F2と915-R2をプライマー対とし、それぞれPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラExタックを添付のプロトコールに従って用い、PCRは $95^{\circ}\text{C}$ で0.5分、 $55^{\circ}\text{C}$ で0.5分、 $72^{\circ}\text{C}$ で1.5分を1サイクルとして、25サイクル行った。反応終了後、各PCR反応物をアガロースゲル電気泳動に供し、約 $0.7 \text{ kb}$ の増幅されたDNA断片を抽出精製した。915-F1と915-R1及び915-F1と915-R2のプライマー対で増幅したDNAは、HindIIIとXbaI (ともに宝酒造社製) で消化し、HindIIIとXbaIで消化したpUC19にT4 DNAリガーゼを用いて連結し、大腸菌JM109を形質転換した。この形質転換体を培養し、約 $0.7 \text{ kb}$ のDNAが挿入されたプラスミドDNAを調製した。その結果、915-F1と915-R1から増幅したDNAが挿入されたプ

ラスミドNo. 1とNo. 2、915-F1と915-R2から増幅したDNAが挿入されたプラスミドNo. 3とNo. 4を得た。

【0210】

また、915-F2と915-R1及び915-F2と915-R2のプライマー対で増幅したDNAをNcoI（宝酒造社製）とXbaIで2重消化し、NcoIとXbaIで2重消化したpTV119N（宝酒造社製）にT4 DNAリガーゼを用いて連結し、大腸菌JM109に形質転換した。

この形質転換体を培養し、約0.7kbのDNAが挿入されたプラスミドDNAを調製した。その結果、915-F2と915-R1から増幅したDNAが挿入されたプラスミドNo. 5とNo. 6、915-F2と915-R2から増幅したDNAが挿入されたプラスミドNo. 7を得た。

【0211】

なお、プラスミドNo. 7で形質転換された大腸菌JM109は、*Escherichia coli* JM109/pTM-RNHと命名、表示され、平成12年9月5日より工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-18018として寄託されている。

【0212】

(3) サーモトガ マリティマ RNaseHII遺伝子の発現

プラスミドNo. 1～7又はpUC19で形質転換された大腸菌JM109を100μg/mlのアンピシリンを含む5mlのLB培地（トリプトン 10g/L、酵母エキス 5g/L、NaCl 5g/L、pH7.2）に植菌し、37℃で振盪培養した。660nmにおける吸光度が0.5になったときに終濃度が1mMになるようにイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを加え、更に1晩振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって菌体を集め、1mlのTE緩衝液に懸濁し、超音波破碎した。これを80℃で10分間熱処理し、遠心によって得た上清を菌体粗抽出液とした。得られた菌体粗抽出液を用いて、参考例2-(5)に記載の方法で、吸光度を測定した。その結果、pUC19を保持する大腸菌JM109から調製した粗抽出液で反応させたときに比べて、プラスミド

No. 3、5、6及び7を保持する大腸菌JM109から調製した菌体粗抽出液は、 $MnCl_2$ 存在下で反応させたとき、明らかに260nmにおける吸光度の値が高かった。よって、プラスミドNo. 3、5、6及び7はRNase H遺伝子を含んでおり、これらのプラスミドを保持する大腸菌でRNase H活性を発現することが明らかになった。

## 【0213】

こうして大腸菌内でRNase H活性が発現していることが明らかとなったプラスミドに挿入されたDNA断片の一部の塩基配列を決定したところ、プラスミドNo. 7に挿入されたDNA断片の一部の塩基配列にPCR時に生じたと思われる塩基置換が1箇所認められ、その箇所のアミノ酸残基が変化していることが分かった。

## 【0214】

## (4) 精製RNase HII 標品の調製

参考例5-(2)で得られたpTM-RNHを大腸菌JM109に形質転換し、得られたpTM-RNHを含む大腸菌JM109を100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む1LのLB培地に植菌し、37℃で16時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を31.0mlのソニケーションバッファー〔50mM トリス-HCl (pH8.0)、2mM 2-メルカプトエタノール、10%グリセロール、2mM フェニルメタンスルフォニルフルオリド〕に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を70℃、15分間の熱処理にかけた。その後、再度12000rpm、10分の遠心分離を行い、上清を集め、32.0mlの熱処理上清液を得た。

## 【0215】

この熱処理上清液をバッファーC〔50mM トリス-HCl (pH8.0)、2mM 2-メルカプトエタノール、10%グリセロール〕で平衡化したRESOURCE Qカラム(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)に供し、FPLCシステム(アマシャム ファルマシア バイオテック社製)を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNase HIIはRESOURCE

Qカラムを素通りした。素通りしたRNase HII画分32.5mlをバッファーCで平衡化したRESOURCE Sカラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、FPLCシステムを用いて0～500mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、約240mM NaClのところに溶出されたRNase II画分を得た。このRNase II画分2.0mlを50mM NaClを含むバッファーCで平衡化したPD-10カラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、得られた溶出液3.5mlを50mM NaClを含むバッファーCで平衡化したHiTrap-heparinカラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、FPLCシステムを用いて50～550mM NaCl直線濃度勾配により溶出した。その結果、約295mM NaClのところに溶出されたRNase II画分を得た。このようにして溶出されたRNase HIIをTma RNase HII標品とした。

上記で得られたTma RNase HII標品を用いて、参考例2-（6）に記載の方法で酵素活性を測定した結果、Tma RNase HII標品にRNase H活性が認められた。

【0216】

#### 参考例6

本発明の方法に使用されるRNase Hのユニット数は、以下の方法で測定した。

##### （1）使用する試薬液の調製

力価測定用反応液：最終濃度がそれぞれ40mM トリス-塩酸（pH7.7、37℃）、4mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、0.003% BSA、4%グリセロール、24μM ポリ（dT）になるように滅菌水で調製した。

ポリ[8-<sup>3</sup>H] アデニル酸溶液：370kBqのポリ[8-<sup>3</sup>H] アデニル酸溶液を200μlの滅菌水に溶解した。

ポリアデニル酸溶液：ポリアデニル酸を3mMになるように滅菌超純水で希釈した。

酵素希釈液：最終濃度がそれぞれ25mM トリス-塩酸（pH7.5、37

℃)、5 mM 2-メルカプトエタノール、0.5 mM EDTA (pH 7.5、37℃)、30 mM 塩化ナトリウム、50%グリセロールになるように滅菌水で調製した。

熱変性子牛胸腺DNAの調製：子牛胸腺DNA 200 mgをTEバッファー 100 mlに懸濁し、膨潤させた。該溶液のUV 260 nmの吸光度を測定し、1 mg/mlの濃度に滅菌超純水で希釈した。次に、該溶液を100℃で10分間加熱後、氷浴中で急冷した。

【0217】

## (2) 活性測定方法

上記(1)で調製した力価測定用反応液985  $\mu$ lにポリ[8-<sup>3</sup>H]アデニル酸溶液7  $\mu$ lを加え37℃で10分間保持した。次にポリアデニル酸を最終濃度が24  $\mu$ Mになるように8  $\mu$ l加え、さらに37℃で5分間保持した。このようにしてポリ[8-<sup>3</sup>H] rA-ポリdT反応液1000  $\mu$ lを調製した。次に、該反応液200  $\mu$ lを分取し、30℃で5分間保持した後、任意の希釈系列で希釈した酵素液1  $\mu$ lを加え、これらの反応液を経時的に50  $\mu$ lずつサンプリングして、後の測定に用いた。酵素添加からサンプリングまでの間の時間をY分とした。また、全CPM用反応液50  $\mu$ lおよびブランク用反応液50  $\mu$ lは、酵素液の代わりに酵素希釈液を1  $\mu$ l加えて調製した。該サンプリング溶液に100 mMピロリン酸ナトリウム100  $\mu$ l、熱変性子牛胸腺DNA溶液50  $\mu$ lおよび10%トリクロロ酢酸300  $\mu$ l(全CPM測定の場合は、超純水300  $\mu$ l)を加え、0℃で5分間保持後、10000 rpmで10分間遠心した。遠心後、得られた上清250  $\mu$ lをバイアルに入れ、アクアソルー2(NENライフサイエンスプロダクツ社製) 10 mlを加え、液体シンチレーションカウンターでCPMを測定した。

【0218】

## (3) ユニット計算

各酵素のユニット(Unit)数は、以下の計算式で算出した。

$$\text{Unit/ml} = \{ (\text{測定したCPM} - \text{ブランクCPM}) \times 1.2^* \times 20 \times 1000 \times \text{希釈率} \} \times 200 (\mu\text{l}) / (\text{全CPM} \times Y \text{分} \times 50 (\mu\text{l}) \times 9^{**})$$



1. 2\*: 全CPM中に含まれるポリ[8-<sup>3</sup>H] rA-ポリdTの50  $\mu$ l当たりのnmol数

9\*\*: 補正係数

【0219】

#### 実施例1

本発明の方法を用いて腸管出血性大腸菌O-157の検出を行った。

本実施例において使用するプライマーを配列表の配列番号31~34に示した。また、配列番号31と32の組み合わせは、O-157のベロ毒素(VT、vero-toxin) 1をコードする配列を、配列番号33と34の組み合わせは、ベロ毒素2をコードする配列を検出するように構築した。鋳型は、ATCC登録番号43895の腸管出血性大腸菌O-157を培養したものを集菌し、適当な細胞数に滅菌水で懸濁した後、98℃で10分間処理した熱抽出物を使用した。以下に反応液組成を示す。

27 mM リン酸バッファー (pH 7.3)、0.01% BSA (牛血清アルブミン)、5% DMSO (ジメチルスルホキシド)、各1 mM dNTP混合物、8 mM 酢酸マグネシウム、それぞれ60 pmolの上記のプライマー対、 $10^4 \sim 10^6$ 細胞数に相当する鋳型DNA (熱水抽出物)、および滅菌蒸留水で反応液容量を48  $\mu$ lにした。上記反応液を98℃、1分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、60 UのE. coli RNase Hを添加し、55℃、60分間保持した。その後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。各反応液3  $\mu$ lを4% ヌシーブ3:1アガロース (宝酒造社製) ゲルにて電気泳動を行なった。その結果、いずれのプライマー対でも $10^4$ 細胞数相当のDNAを鋳型として、O-157ベロ毒素1および2を検出することができ、本発明の方法が、病毒性細菌の検出方法として利用できることを確認した。

【0220】

#### 実施例2

(1) 本発明の方法においてバッファーの種類を変えて検討した。本実施例において使用するプライマーは、配列表の配列番号39及び40記載の配列を有する

$\lambda$  DNA増幅用のプライマーを用いた。反応は、以下のように行った。すなわち、各120 pmolの上記プライマー、0.01%プロピレンジアミン水溶液、10 ngまたは1 ngの鋳型DNAの混合液10  $\mu$ lを98℃で2分間、熱変性させた後、氷中で冷却し、プライマーを鋳型DNAにアニールさせた。なお、該鋳型は、 $\lambda$  DNA（宝酒造社製）を鋳型とし、配列表の配列番号41及び42記載のプライマーを使用したPCRによって得られた増幅産物（1005 bp）をSuprec02（宝酒造社製）で精製したものをを用いた。

## 【0221】

アニーリング処理後、上記混合液に各0.625 mM dNTP混合物、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA（ウシ血清アルブミン）、1.25% DMSO（ジメチルスルホキシド）、30 UのE. coli RNase H及び11 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む3種類の反应用緩衝液（42.5 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液（pH 8.5）、42.5 mM ピシン-水酸化カリウム緩衝液（pH 8.3）及び42.5 mM ヘプス-水酸化カリウム緩衝液（pH 7.8））40  $\mu$ lを添加し、最終容量を50  $\mu$ lにした。該反応液は、60℃で1時間保持した。反応終了後、反応液3  $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動で確認したところ、いずれの鋳型量においても目的の増幅断片が確認できた。特に、ピシン-水酸化カリウム緩衝液（pH 8.5）を用いた反応系でより多くの増幅産物が得られた。

## 【0222】

（2）さらに、ヘプス-水酸化カリウムバッファーによる反応性の向上について検討した。鋳型は、pUC19プラスミドDNAのマルチクローニングサイトに約150 bpのDNA断片を挿入したものをを用いた。該鋳型は、以下のようにして調製した。

配列表の配列番号134および135記載の配列を有するpUC19 upper 150 PCRプライマー、pUC19 lower PCRプライマーを使用し、pUC19プラスミドDNA100 pgを鋳型としてPCR反応を行った。得られた増幅断片は、マイクロコン-100で精製後、DNA blunting kit（宝酒造社製）を用いて平滑末端化し、pUC19プラスミドの

HincIIサイトにサブクローニングした。上記増幅断片の挿入されたプラスミドを用いて、大腸菌JM109を形質転換した。該形質転換体を培養し、その菌体よりQIAGEN plasmid mini kit (キアゲン社製)を用いてDNA挿入プラスミドを精製した。このDNA挿入プラスミドを鋳型として使用した。

上記の方法で調製したpUC19-150プラスミドDNAを鋳型とし、配列表の配列番号35及び36記載の塩基配列を有するMCS-FおよびMCS-RプライマーによりPCR増幅したDNA断片を鋳型とした。また、キメラオリゴヌクレオチドプライマーとしては、配列表の配列番号37及び38記載の塩基配列を有するMF2N3(24)プライマーおよびMR1N3(24)プライマーを使用した。該プライマーの組合せにより約350bpの増幅断片が得られる。

#### 【0223】

検討するバッファーは、ヘプスー水酸化カリウムバッファー系を選択し、対照としてリン酸カリウムバッファー系、トリシンバッファー系を使用した。以下に反応液組成を示す。

反応液A；上記PCR増幅断片10ng、各50pmolずつのMF2N3(24)プライマーおよびMR1N3(24)プライマー、0.01%プロピレンジアミン水溶液、および滅菌蒸留水で反応液量を10 $\mu$ lとした。

反応液B；以下の3種類を調製した。

リン酸カリウムバッファー系：最終濃度35mM リン酸カリウムバッファー(pH7.5)、1.25% DMSO、0.0125% BSA、5mM 酢酸マグネシウム、各0.625mM dNTP混合物、60UのE. coli RNase Hおよび5.5UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含有する反応液40 $\mu$ lを調製した。

トリシンバッファー系：最終濃度42.5mM トリシンバッファー(pH8.7)、12.5mM塩化カリウム、12.5mM硫酸アンモニウム、1.25% DMSO、0.0125% BSA、5mM 酢酸マグネシウム、各0.625mM dNTP混合物、30UのE. coli RNase Hおよび5.5UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含有する反応液40 $\mu$ lを調製した。

ヘブスー水酸化カリウムバッファー系：最終濃度 2.5 mM ヘブスー水酸化カリウムバッファー (pH 7.8)、1.25 mM 酢酸カリウム、1.25% DM SO、0.0125% BSA、5 mM 酢酸マグネシウム、各 0.625 mM dNTP 混合物、30 U の E. coli RNase H および 5.5 U の Bca BEST DNA ポリメラーゼを含有する反応液 40  $\mu$ l を調製した。

## 【0224】

上記反応液 A を 98℃、2 分間熱変性処理した後、60℃または 65℃に冷却したのち氷上に静置した。氷上に置いておいた反応液 A に上記各反応液 B を加えて混合し、反応液を 50  $\mu$ l とした。該反応液を 60℃または 65℃で 1 時間インキュベートした。反応終了後 4℃に冷却し、1/10 容量の 0.5 M EDTA を加えて反応を停止させた。この反応液 3  $\mu$ l を 3% ヌシーブ 3:1 アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、反応温度に関わらず、3 種類のバッファー系で目的の増幅断片が確認できた。特に本実施例においては、ヘブスー水酸化カリウムバッファー系が最も増幅産物量が多く、反応性が高いことが確認できた。

## 【0225】

## 実施例 3

(1) 本発明の方法について、プライマーと鋳型のアニーリング条件について検討した。WO 97/32010 号公報パンフレット記載のフラボバクテリウム属細菌、*Flavobacterium* sp. SA-0082 (通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 [日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566)] に平成 7 年 (1995 年) 3 月 29 日より FERM P-14872 として寄託され、また前記通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM BP-5402 [国際寄託への移管請求日：平成 8 年 (1996 年) 2 月 15 日] として寄託されている。) の部分塩基配列に従って、配列表の配列番号 43 及び 44 記載の塩基配列を有するプライマーを使用した。また、本実施例においては、*Flavobacterium* sp. SA-0082 由来のゲノム DNA を鋳型とし、配列表の配列番号 45 及び 46 記載のプライマーの組み合わせによる PCR 増幅産物 (573 bp) を Suprec 02 (宝酒造社製) で精製したものを鋳型 DNA として用いた。反応は以下のように行った。すなわち、各 120 pmol の上記プライマーに 2

種類のアニーリング溶液（500 mM 塩化カリウム及び8  $\mu$ M スペルミジン、あるいは0.05%プロピレンジアミン）をそれぞれ2  $\mu$ l添加し、さらに10 ngまたは1 ngの上記PCR増幅断片を含む最終液量10  $\mu$ lの混合液を98℃で2分間、熱変性させた。変性後、水中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニールさせた。

# 【0226】

上記アニーリング処理後、該混合液に各0.625 mM dNTP混合物、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA（ウシ血清アルブミン）、1.25% DMSO（ジメチルスルホキシド）、30 UのE. coli RNase H及び11 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む3種類の緩衝液（42.5 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液（pH 8.5）緩衝液、42.5 mM ピシン-水酸化カリウム緩衝液（pH 8.3）、及び42.5 mM ヘプス-水酸化カリウム緩衝液（pH 7.8））のそれぞれを40  $\mu$ l添加し、最終容量を50  $\mu$ lにした。該反応液は、52℃で1時間保持した。反応終了後、反応液3  $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図1に示す。図1は、アニーリング溶液と緩衝液のそれぞれの組み合わせについての反応後の電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー（100 bpラダー、宝酒造社製）、レーン2はプロピレンジアミン/トリシン（鋳型10 ng）、レーン3はプロピレンジアミン/ヘプス（鋳型10 ng）、レーン4はプロピレンジアミン/ヘプス（鋳型1 ng）、レーン5はプロピレンジアミン/ピシン（鋳型10 ng）、レーン6は、プロピレンジアミン/ピシン（鋳型1 ng）、レーン7は500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ Mスペルミジン/ピシン（鋳型10 ng）、レーン8は500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ Mスペルミジン/ピシン（鋳型1 ng）、レーン9は分子量マーカー（100 bpラダー）、レーン10はプロピレンジアミン/トリシン（鋳型1 ng）、レーン11は500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ Mスペルミジン/トリシン（鋳型1 ng）、レーン12はプロピレンジアミン/ヘプス（鋳型1 ng）、レーン13は500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ Mスペルミジン/ヘプス（鋳型1 ng）、レーン14はプロピレンジアミン/ピシン（鋳型1 ng）、レーン15は500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ Mスペル

ミジン／ピシン（鋳型 1 n g）である。

【0 2 2 7】

図 1 に示したように、鋳型 DNA 量に関わらず、上記 3 種類のいずれの緩衝液においてもプライマーと鋳型 DNA のアニーリングに 5 0 0 m M 塩化カリウム + 8  $\mu$  M スペルミジンを含むアニーリング溶液を使用したものがより多くの目的と増幅産物が得られた。特に本実施例においては、5 0 0 m M 塩化カリウム + 8  $\mu$  M スペルミジンを含むアニーリング溶液とピシン－水酸化カリウム緩衝液との組み合わせが良好であった。

【0 2 2 8】

(2)  $\lambda$  DNA の PCR 増幅断片を鋳型とした場合のアニーリング溶液の効果について検討した。本実施例において、実施例 2 (1) 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。鋳型 DNA は、実施例 2 (1) で調製した PCR 増幅断片及び  $\lambda$  DNA を用いた。反応は、以下のように行った。すなわち、各 1 2 0 p m o l の上記プライマーに 3 種類のアニーリング溶液 (5 0 0 m M 塩化カリウム及び 8  $\mu$  M スペルミジン、0. 0 5 % プロピレンジアミンまたは滅菌水) をそれぞれ 2  $\mu$  l 加え、さらに 1 0 n g または 1 n g の PCR 増幅断片を含む全液量 1 0  $\mu$  l の混合液を調製した。該混合液を 9 8  $^{\circ}$  C で 2 分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニールさせた。

【0 2 2 9】

アニーリング処理後に各 0. 6 2 5 m M d N T P 混合物、5. 0 m M 酢酸マグネシウム、0. 0 1 2 5 % B S A、1. 2 5 % D M S O、3 0 U の E. c o l i R N a s e H 及び 1 1 U の B c a B E S T DNA ポリメラーゼを含む 3 種類の緩衝液 (4 2. 5 m M トリシン－水酸化カリウム緩衝液 (p H 8. 5)、4 2. 5 m M ピシン－水酸化カリウム緩衝液 (p H 8. 3)、及び 4 2. 5 m M ヘプス－水酸化カリウム緩衝液 (p H 7. 8)) をそれぞれ 4 0  $\mu$  l 添加し、最終容量を 5 0  $\mu$  l にした。該反応液を 6 0  $^{\circ}$  C で 1 時間保持した。反応終了後、該反応液 3  $\mu$  l を 3. 0 % アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図 2 に示す。図 2 は、鋳型量と反応緩衝液とアニーリング溶液の組み合わせについて検討した結果の電気泳動写真であり、レーン 1 はマーカー (1 0 0 b p ラダ

一)、レーン2は鋳型10 ngでトリシン/500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ M スペルミジンの組み合わせ、レーン3は鋳型1 ngでトリシン/500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ M スペルミジンの組み合わせ、レーン4は鋳型10 ngでピシン/500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ M スペルミジンの組み合わせ、レーン5は鋳型1 ngでピシン/500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ M スペルミジンの組み合わせ、レーン6は鋳型10 ngでヘPes/500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ M スペルミジンの組み合わせ、レーン7は鋳型1 ngでヘPes/500 mM塩化カリウム及び8  $\mu$ M スペルミジンの組み合わせ、レーン8は分子量マーカー(100 bpラダー)、レーン9は、鋳型10 ngでトリシン/プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン10は鋳型1 ngでトリシン/プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン11は鋳型10 ngでピシン/プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン12は鋳型1 ngでピシン/プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン13は鋳型10 ngでヘPes/プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン14は鋳型1 ngでヘPes/プロピレンジアミンの組み合わせ、レーン15は分子量マーカー(100 bpラダー)、レーン16は鋳型10 ngでトリシン/水の組み合わせ、レーン17は鋳型1 ngでトリシン/水の組み合わせ、レーン18は鋳型10 ngでピシン/水の組み合わせ、レーン19は鋳型1 ngでピシン/水の組み合わせ、レーン20は鋳型10 ngでヘPes/水の組み合わせ、レーン21は鋳型1 ngでヘPes/水の組み合わせである。

## 【0230】

図2に示したように、鋳型DNA量に関わらず、上記3種類の緩衝液と上記3種類のアニーリング溶液の組み合わせのいずれにおいても目的の増幅断片が得られることが確認できた。特に、ピシン緩衝液と500 mM 塩化カリウム及び8  $\mu$ M スペルミジンを含むアニーリング溶液との組み合わせにおいて、より多くの増幅断片が得られることが確認できた。

## 【0231】

## 実施例4

逆転写酵素(RTase)阻害剤存在下での本発明の方法について検討した。上記RTase阻害剤としてホスホノギ酸(PFA: Phosphonoformic acid)を

用いた。本実施例においてプライマーは、配列表の配列番号47及び48記載のものを使用した。また、鋳型DNAとしては、腸管出血性大腸菌O-157のゲノムDNAを鋳型とし、配列表の配列番号49及び50記載のプライマーによるPCR増幅産物(576bp)をSuprec02(宝酒造社製)で精製したものを用いた。反応は以下のように行った。すなわち、各120pmolの上記プライマーと2 $\mu$ lの500mM塩化カリウム及び8 $\mu$ Mスベルミジンを含むアニーリング溶液に1ngのPCR増幅断片を添加した全液量10 $\mu$ lの混合液を、98℃で2分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニールさせた。

## 【0232】

上記アニーリング処理後、該処理液に各0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH8.5)、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA(ウシ血清アルブミン)、1.25% DMSO(ジメチルスルホキシド)、30UのE. coli RNaseH、11UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む40 $\mu$ lを添加し、さらに500 $\mu$ g/mlあるいは50 $\mu$ g/mlの濃度になるようにPFAを加え、最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液は、55℃で1時間保持した。対照として、PFAを添加しない系も同様に調製した。反応終了後の反応液9 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図3に示す。図3は、逆転写酵素活性阻害剤の効果を示す電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー(100bpラダー)、レーン2はPFA無添加、レーン3は500 $\mu$ g/mlのPFA添加、レーン4は50 $\mu$ g/mlのPFA添加結果である。

## 【0233】

図3に示したように、PFAを添加することにより非特異的な増幅が抑制され、さらに目的の増幅断片が確認できた。特に500 $\mu$ g/mlになるように添加した系では、添加していない系で見られる非特異的な増幅産物が見られず、目的の増幅断片が明瞭に増幅されていることが確認できた。

## 【0234】

## 実施例5



本発明の方法について増幅断片長と検出感度の関係について検討した。

(1) 配列表の配列番号51～53記載の大腸菌O-157ベロ毒素増幅用プライマーを合成した。さらに、実施例4で使用したキメラオリゴヌクレオチドプライマーも使用した。上記プライマーの組み合わせと増幅断片長は、配列表の配列番号51及び48の組み合わせで247bp、52及び53の組み合わせで168bp、52及び48の組み合わせで206bp、47及び53の組み合わせで135bp、47及び48の組み合わせで173bpである。本実施例において鋳型DNAは、実施例4で調製した576bpのPCR増幅断片精製物を用いた。反応は、以下のように行った。すなわち、上記各60pmolのプライマーと2μlの0.05%プロピレンジアミン水溶液、10fg～10ngの上記PCR増幅断片を含む全液量10μlの混合液をサーマルサイクラーパーソナル（宝酒造社製）で98℃で2分間熱変性後、55℃に冷却し、鋳型にプライマーをアニーリングさせた。

#### 【0235】

上記アニーリング処理した混合液に0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液（pH8.5）、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA（ウシ血清アルブミン）、1.25% DMSO（ジメチルスルホキシド）、30UのE. coli RNaseH、5.5UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、及び滅菌水を含む全液量40μlの反応液を添加し、最終容量を50μlにした。該反応液は、55℃で1時間保持した。反応終了後、該反応液5μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。対照として、配列表の配列番号54及び55記載のプライマーを用いて、上記PCR増幅断片1pg～10fgの検出を行った。上記プライマーの組み合わせにより、135bpの増幅断片が得られる。すなわち、各60pmolのプライマー、10×Ex Taqバッファー（宝酒造社製）5μl、1.25Uのタカラ Ex Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）、0.2mM dNTP混合物を含む全量50μlのPCR溶液を調製した。PCR条件は、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクル（所要時間は、2分38秒）とした25または30サイクルで行った。反応終了後、ICAN法の場合は1

$\mu$ l、PCR法の場合は、5  $\mu$ lの反応液を3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図4及び表1に示す。

【0236】

【表1】

表1	
増幅サイズ(bp)	検出限界
ICAN法; (全所要時間、70分)	
247	100pg
168	100fg
206	100pg
135	10fg
173	100fg
PCR法 (25サイクル: 全所要時間、約66分)	
135	100fg
PCR法 (30サイクル: 全所要時間、約80分)	
135	10fg

【0237】

図4は、ICAN法（反応液の1/50量を泳動）及びPCR法（反応液の1/10量を泳動）での増幅鎖長135bpの場合の検出限界を示す電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー（100bpラダー）、レーン2はICAN法で鋳型1pgの場合、レーン3はICAN法で鋳型100fgの場合、レーン4はICAN法で鋳型10fgの場合、レーン5は25サイクルのPCR法で鋳型1pgの場合、レーン6は25サイクルのPCR法で鋳型100fgの場合、レーン7は25サイクルのPCR法で鋳型10fgの場合、レーン8は30サイクルのPCR法で鋳型1pgの場合、レーン9は30サイクルのPCR法で鋳型100fgの場合、レーン10は30サイクルのPCR法で鋳型10fgの場合である。

【0238】

表1に示したようにPCR法とほぼ同等の検出感度を得られることを確認した。さらに、同じ検出感度の場合、PCR法の反応所要時間約80分に比べ、本発明の方法の反応所要時間は70分となり、所要時間の短縮ができることを確認した。

## 【0239】

(2) 配列表の配列番号39、40及び56記載の塩基配列を有するλDNA増幅用のプライマーを合成した。該プライマーの組み合わせと増幅断片長は、配列表の配列番号39及び40の場合は151bp、56及び40の場合は125bpである。また、本実施例において鋳型DNAは、実施例2(1)で調製したものを使用した。反応は以下のように行った。すなわち、各120pmolの上記プライマーに2μlのアニーリング溶液(500mM 塩化カリウム及び8μM スペルミジン)と、1fg~1ngの鋳型を加え、滅菌水で全液量を10μlにした。該液を98℃で2分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。

## 【0240】

アニーリング処理後、上記混合液に各0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH8.5)、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA、1.25% DMSO、30UのE. coli RNase H、11UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む40μlを添加し、滅菌水で最終容量を50μlにした。該反応液は、60℃で1時間保持した。反応終了後、該反応液3μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を表2に示した。

## 【0241】

【表2】

表2

増幅サイズ (bp)	検出限界
125	10fg
151	100fg

## 【0242】

表2に示したように $\lambda$  DNAを鋳型にした場合においても、最適な領域を検討することにより、検出感度を10 fgまで下げることができることを確認した。

## 【0243】

(3) 配列表の配列番号57及び58記載の塩基配列を有する菊ウィロイド遺伝子増幅用プライマーを合成し、ウィロイド感染菊由来RNAを鋳型として特願平9-140383公報記載の方法で調製した増幅断片(全長340 bp)をプラスミドT7ブルーTベクター(宝酒造製)に挿入して調製した。これで大腸菌JM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換し、LB培地5 mlにて37℃ 16時間培養した。菌体を回収し、QIAGEN Plasmid Mini Kit(キアゲン社製)を用いてマニュアルに従い、プラスミドの精製をおこなった。ベックマンDU-600(ベックマン製)にて濃度測定を行い、滅菌水にて1  $\mu$  lあたりプラスミド濃度0、1 fg、10 fg、100 fg、1 pg、10 pg、100 pg、1 ngに調製した。ICAN反応系50  $\mu$  lにおいて上記調製プラスミド溶液1  $\mu$  lを鋳型として用いた。本実施例においてプライマーは、配列表の配列番号59及び60記載の塩基配列を有するCSVD-F2プライマー及びCSVD-R6プライマーを使用した。反応は、以下のように行った。すなわち、上記プライマー各50 pmol、各調製プラスミド溶液1  $\mu$  l及び最終濃度0.01%プロピレンジアミンを含む全液量10  $\mu$  lの混合液を調製した。該混合液をサーマルサイクラーパーソナル(宝酒造製)にて98℃、2分間熱処理後、60℃まで冷却し、1分間保持後、氷上に保存した。

## 【0244】

アニーリング処理後、上記混合液に最終濃度20 mM ヘプスー水酸化カリウムバッファー(pH 7.8)、100 mM 酢酸カリウム、1% DMSO、0.01% BSA、4 mM 酢酸マグネシウム、各500  $\mu$  M dNTP混合物、30 UのE. coli RNase H、5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を50  $\mu$  lにした。該反応液をあらかじめ、60℃に設定したサーマルサイクラーパーソナルにセットし60分間反応させた。反応終了後、各反応液3  $\mu$  lを3%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に

供した。その結果、目的とする増幅産物（約90bp、約70bp、約50bp）について、10fgの鋳型濃度の場合まで確認できた。

【0245】

#### 実施例6

本発明の方法で使用するプライマーについて検討した。

(1) プライマーの $T_m$ 値と反応温度について検討した。配列表の配列番号43及び61～63記載の塩基配列を有する、フラボバクテリウム属 (*Flavobacterium* sp. SA-0082) 増幅用プライマーを合成した。さらに該プライマーは、160bp以下でGC含量が約20%の領域を増幅するように構築した。該プライマーの組み合わせと増幅断片長は、配列表の配列番号43及び62の場合は126bp、43及び63の場合は158bp、61及び62の場合は91bp、61及び63の場合は123bpである。なお、本実施例において鋳型となるDNAは、実施例3(1)で調製したPCR増幅産物を用いた。反応は以下のように行った。すなわち、各120pmolの上記プライマー、2 $\mu$ lの3種類のアニーリング溶液（500mM 塩化カリウム及び8 $\mu$ M スペルミジン、0.05%プロピレンジアミン、または水）及び、1fg～10ngの鋳型を含む全液量10 $\mu$ lの混合液を調製した。該混合液を98℃で2分間、熱変性させた後、氷中で冷却することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。

【0246】

アニーリング処理後、上記混合液に各0.625mM dNTP混合物、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA（ウシ血清アルブミン）、1.25% DMSO（ジメチルスルホキシド）、30Uの*E. coli* RNase H及び11Uの*BcaBEST* DNAポリメラーゼを含む3種類の緩衝液（17mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液（pH8.5）、17mM ピシン-水酸化カリウム緩衝液（pH8.3）、及び20mM ヘプス-水酸化カリウム緩衝液（pH7.8））を40 $\mu$ lを添加し、最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液を52℃、55℃または60℃で1時間保持した。反応終了後、反応液3 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、反応温度が52℃の場合に目的の増幅断片が確認できた。特に、500mM塩化カリウム及び8

$\mu$ M スペルミジンを含むアニーリング溶液とトリシン、あるいはピシン緩衝液の組み合わせにおいてより多くの目的とする増幅断片が得られた。反応温度が52℃におけるプライマー対、増幅断片長及び検出感度について図5及び表3に示す。

【0247】

【表3】

表3

増幅サイズ (bp)	検出限界
126	100 fg
158	1 pg
91	1 fg
123	100 fg

【0248】

図5は、ATリッチな領域を増幅する場合の増幅断片長と鋳型DNA量の関係を示した電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー（100 bp ラダー）、レーン2は増幅断片長91 bpで鋳型1 pgの場合、レーン3は増幅断片長91 bpで鋳型100 fgの場合、レーン4は増幅断片長91 bpで鋳型10 fgの場合、レーン5は増幅断片長91 bpで鋳型1 fgの場合、レーン6は増幅断片長123 bpで鋳型1 pgの場合、レーン7は増幅断片長123 bpで鋳型100 fgの場合、レーン8は増幅断片長123 bpで鋳型10 fgの場合、レーン9は増幅断片長126 bpで鋳型1 pgの場合、レーン10は増幅断片長126 bpで鋳型100 fgの場合、レーン11は増幅断片長126 bpで鋳型10 fgの場合、レーン12は増幅断片長158 bpで鋳型1 pgの場合、レーン13は増幅断片長158 bpで鋳型100 fgの場合、レーン14は増幅断片長158 bpで鋳型10 fgの場合である。

【0249】

図5及び表3に示したように、ATリッチな鋳型に対し、ATリッチなプライマーセットで本発明の方法を行う場合は、プライマーの $T_m$ 値にあわせて、反応

温度を下げるの良いことが明らかになった。

# 【 0 2 5 0 】

(2) 本発明の方法においてプライマーの高次構造が反応性に影響を与えることが考えられた。従って、プライマーの高次構造を回避し、プライマーが本来の鋳型にアニーリングしやすくするためのプライマーの修飾を検討した。プライマーは、配列表の配列番号 4 7 ~ 4 8 及び 6 4 ~ 6 9 記載のそれぞれのプライマーを使用した。すなわち、配列表の配列番号 4 7 記載の塩基配列を有するプライマー、配列番号 6 4 ~ 6 6 記載の塩基配列を有するプライマーで、さらに 3' 末端より 4 塩基目、5 塩基目、6 塩基目の塩基がそれぞれイノシンデオキシヌクレオチドである 1 2 0 I 4、1 2 1 I 5 及び 1 2 2 I 6 プライマー、配列表の配列番号 1 0 4 記載の塩基配列を有するプライマー、配列番号 6 7 ~ 6 9 記載の塩基配列を有するプライマーで、さらに 3' 末端より 4 塩基目、5 塩基目、6 塩基目の塩基がそれぞれイノシンデオキシヌクレオチドである 1 2 3 I 4、1 2 4 I 5 及び 1 2 5 I 6 プライマーを使用した。本実施例において鋳型 DNA は、実施例 4 で調製したものをを使用した。反応は、以下のように行った。すなわち、前記各 5 0 p m o l のプライマー、2  $\mu$  l の 0. 0 5 % プロピレンジアミン水溶液、1 n g ~ 1 0 n g の鋳型 DNA 及び滅菌蒸留水を含む全液量 1 0  $\mu$  l の混合液をサーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9 6 0 0、アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、9 8  $^{\circ}$ C で 2 分間、続いて 5 5  $^{\circ}$ C まで冷却し、1 分間保持した。

# 【 0 2 5 1 】

アニーリング処理後、該混合液に 0. 6 2 5 m M d N T P 混合物、4 2. 5 m M トリシン-水酸化カリウム緩衝液 (p H 8. 5)、5. 0 m M 酢酸マグネシウム、0. 0 1 2 5 % B S A、1. 2 5 % D M S O、3 0 U の E. c o l i R N a s e H あるいは 5 U のサーマス サーモフィラス (T t h) 由来耐熱性 R N a s e H (東洋紡社製、以下 T t h R N a s e H と記載する。) 及び 5. 5 U の B c a B E S T DNA ポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を 5 0  $\mu$  l にした。該反応液は、5 5  $^{\circ}$ C で 1 時間保持した。反応終了後、反応液 5  $\mu$  l を 3. 0 % アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図 6 に示す。

## 【0252】

図6は、E. coli RNase H及びTth RNase Hを使用した場合のイノシンデオキシヌクレオチド含有キメラオリゴヌクレオチドプライマーの効果について示した電気泳動写真でありレーン2～レーン9までは、E. coli RNase H、レーン10～17は、Tth RNase Hを使用した場合である。レーン1は分子量マーカー（100bpラダー）、レーン2は配列番号47及び48記載のプライマー対で鋳型1ngの場合、レーン3は、120I4及び123I4プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン4は、121I5及び124I5プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン5は、122I6及び125I6プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン6は配列表の配列番号47及び48記載のプライマー対で鋳型10ngの場合、レーン7は、120I4及び123I4プライマー対で鋳型10ngの場合、レーン8は、121I5及び124I5プライマー対で鋳型10ngの場合、レーン9は、122I6及び125I6プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン10は、配列表の配列番号47及び48記載のプライマー対で鋳型1ngの場合、レーン11は、120I4及び123I4プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン12は、121I5及び124I5プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン13は、122I6及び125I6プライマー対で鋳型1ngの場合、レーン14は配列表の配列番号47及び48記載のプライマー対で鋳型10ngの場合、レーン15は、120I4及び123I4プライマー対で鋳型10ngの場合、レーン16は、121I5及び124I5プライマー対で鋳型10ngの場合、レーン17は、122I6及び125I6プライマー対で鋳型10ngの場合である。

## 【0253】

図6に示したように、鋳型量に関わらず、また、大腸菌由来RNase Hあるいはサーマス サーマフィラス由来耐熱性RNase Hのいずれを用いた場合においてもプライマーの3'末端より4塩基目あるいは5塩基目にイノシンを導入したプライマーにおいて目的の増幅産物の増加が確認できた。このことより、イノシンを適当な位置に入れることにより、ICANの反応性が向上することが明らかになった。



## 【0254】

(3) 上記(2)と同様の目的でプライマーの検討を行った。プライマーは、配列表の配列番号84及び85記載の塩基配列の塩基配列を有するプライマーで、さらに3'末端の3塩基が( $\alpha$ -S、あるいはalpha-thio)リボヌクレオチドであるもの、すなわち、RNA部分が5'-ホスホチオエート結合を持つオリゴヌクレオチドプライマー1Sおよび4Sを合成した。また、配列表の配列番号70及び71記載の塩基配列を有するプライマーで、さらに3'末端の3塩基と該プライマーのデオキシリボヌクレオチド部分の配列の一部がリボヌクレオチドである、すなわち、該プライマーの3'末端より11塩基目から13塩基目までがリボヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドプライマー1N3N3および4N3N3を合成した。鋳型となるDNAは、実施例4で調製したものを使用した。反応は、以下のように行った。すなわち、前記各50 pmolのプライマー、2  $\mu$ lの0.05%プロピレンジアミン水溶液、10 ngの鋳型DNA及び滅菌水を含む全液量10  $\mu$ lの混合液をサーマルサイクラーを用いて、98℃で2分間加熱処理を行ったのち、氷中に移し冷却した。

## 【0255】

アニーリング処理後、上記混合液に0.625 mM dNTP混合物、42.5 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH 8.5)、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA、1.25% DMSO、30 UのE. coli RNase Hあるいは5 UのTth RNase H及び5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む全液量40  $\mu$ lを加え、滅菌水で最終容量を50  $\mu$ lにした。該反応液を、サーマルサイクラーで55℃で1時間保持した。

反応終了後、反応液5  $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、いずれのRNase Hを用いた場合においても、1Sと4Sのプライマーの組み合わせおよび1N3N3と4N3N3のプライマーの組み合わせにおいて目的の位置に明らかな増幅産物が確認できた。このことから、プライマーの3'末端部分の5'-ホスホチオエート化は、本発明の方法において有効であることを確認した。さらに、プライマーの3'末端に加え、内部の適当な位置をリボヌ

クレオチドに置き換えた場合でも本発明の方法の反応性の向上に有効であることを確認した。

## 【0256】

## 実施例 7

特定の金属イオン存在下で *E. coli* RNase H 活性を有する DNA ポリメラーゼを用いた本発明の方法について検討した。実施例 2 (1) で使用したキメラオリゴヌクレオチドプライマーを各 120 pmol、2  $\mu$ l の 500 mM 塩化カリウム及び 8  $\mu$ M スペルミジンを含むアニーリング溶液、実施例 2 (1) で用いた 1 ng の鋳型 DNA 及び滅菌水含む全液量 10  $\mu$ l の混合液を 98℃ で 2 分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。アニーリング処理後、該混合液に各 0.625 mM dNTP 混合物、42.5 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液 (pH 8.5)、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA (ウシ血清アルブミン)、1.0% DMSO (ジメチルスルホキシド)、11 U の BcaBEST DNA ポリメラーゼを含む 40  $\mu$ l を添加し、さらに塩化マンガン (ナカライテスク社製) を 0.5 mM、2.5 mM、5.0 mM、10 mM の濃度になるように加え、滅菌水で最終容量を 50  $\mu$ l にした。該反応液は、60℃ で 1 時間保持した。さらに、対照として塩化マンガンを添加しないもの、及び 30 U の *E. coli* RNase H を添加し、塩化マンガンを添加しないものも調製した。反応終了後、反応液 3  $\mu$ l を 3.0% アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図 7 に示す。

## 【0257】

図 7 は、BcaBEST DNA ポリメラーゼの RNase H 活性を利用した場合の ICAN 法の結果を示す電気泳動写真であり、レーン 1 は分子量マーカー (100 bp ラダー)、レーン 2 は塩化マンガン無添加/*E. coli* RNase H 添加の場合、レーン 3 は塩化マンガン無添加/*E. coli* RNase H 無添加の場合、レーン 4 は 0.5 mM 塩化マンガン添加/*E. coli* RNase H 無添加の場合、レーン 5 は 2.5 mM 塩化マンガン添加/*E. coli* RNase H 無添加の場合、レーン 6 は 5.0 mM 塩化マンガン添加/*E. c*

coli RNase H無添加の場合、レーン7は10.0 mM塩化マンガン添加／E. coli RNase H無添加の場合を示す。

【0258】

図7に示したようにE. coli RNase H非存在下において、塩化マンガンをも2.5 mMになるように添加した反応系で、目的の増幅産物が確認された。

【0259】

#### 実施例8

本発明の方法について、実際の生体試料で検討した。

(1) ATCC登録番号43895の腸管出血性大腸菌O-157を培養後、熱水抽出した物を鋳型として検出を行った。腸管出血性大腸菌O-157をノボビオシン加mEC培地にて42℃、18時間培養後、95℃、10分間熱処理を行った。これを滅菌水にて0、1、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ セルに相当するO-157熱水抽出物を調製した。このO-157熱水抽出物を用い、実施例5(1)と同様の条件で、ベロ毒素2型(VT2)遺伝子の増幅を行った。また、対照として、同じ鋳型を用いて実施例5(1)記載の条件でPCR増幅も行った。反応終了後、ICAN法では反応液1  $\mu$ l、PCR法では、反応液5  $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を表4及び図8に示す。

【0260】

【表 4】

表4	
増幅サイズ (bp)	検出限界 (セル)
ICAN法: 所要時間、70分	
135	$10^2$
173	$10^3$
PCR法 (25サイクル: 所要時間、約66分)	
135	$10^3$
PCR法: (30サイクル、 所要時間、約80分)	
135	$10^2$

## 【0261】

図8は、ICAN法及びPCR法を用いた大腸菌O157の検出を示す電気泳動写真であり、増幅鎖長は135bpである。レーン1は分子量マーカ（100bpラダー）、レーン2はICAN法で細胞 $10^4$ 個、レーン3はICAN法で細胞 $10^3$ 個、レーン4はICAN法で細胞 $10^2$ 個、レーン5は25サイクルのPCRで細胞 $10^4$ 個、レーン6は25サイクルのPCR法で細胞 $10^3$ 個、レーン7は25サイクルのPCRで細胞 $10^2$ 個、レーン8は30サイクルのPCRで細胞 $10^4$ 個、レーン9は30サイクルのPCR法で細胞 $10^3$ 個、レーン10は30サイクルのPCRで細胞 $10^2$ 個の場合である。

## 【0262】

表4及び図8に示したように、本発明の検出方法は、PCR法と同等の検出感度を有し、さらにPCR法よりも短時間で検出できることを確認した。

## 【0263】

(2) 実施例2及び4で用いた配列表の配列番号40及び56のプライマーを用いて、λDNAを検出した。反応は、以下のように行った。すなわち、前記各120pmolのプライマー、2μlの500mM塩化カリウム及び8μMスベルミジンを含むアニーリング溶液、10fg~1ngのλDNA（宝酒造社製）及び滅菌水を含む全液量10μlの混合液を調製し、98℃で2分間、熱変性

させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。

【0264】

アニーリング処理後、該混合液に各0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH8.5)、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA(ウシ血清アルブミン)、1.25% DMSO(ジメチルスルホキシド)、30UのE. coli RNase H及び11UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む40 $\mu$ lを添加し、滅菌水で最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液は、60℃で1時間保持した。反応終了後、反応液3 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を表5に示す。

【0265】

【表5】

表5	増幅サイズ(bp)	検出限界
	125	1pg

【0266】

表5に示したように、 $\lambda$  DNAの検出において本発明の方法は有効であることを確認した。

【0267】

(3) フラボバクテリウム細菌(Flavobacterium sp. SA-0082)のゲノムDNAを鋳型とし、実施例6(1)で用いた配列表の配列番号61及び62記載のプライマーを用いて検出を行った。鋳型として、WO97/32010号公報パンフレット記載の方法で培養したフラボバクテリウム細菌からゲノムDNAを常法により調製した。反応は、以下のように行った。すなわち、前記各120pmolのプライマー、2 $\mu$ lの500mM 塩化カリウム及び8 $\mu$ M スペルミジンを含むアニーリング溶液、10fg~1ngのゲノムDNA及び滅菌水で全液量10 $\mu$ lの混合液を調製し、98℃で2分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニーリングさせた。

## 【0268】

アニーリング処理後、上記混合液に各0.625mM dNTP混合物、42.5mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液(pH8.5)、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA、1.25% DMSO、30UのE. coli RNase H及び11UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む40 $\mu$ lを添加し、滅菌水で最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液は、52℃で1時間保持した。反応終了後、反応液3 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を表6及び図9に示す。

## 【0269】

【表6】

表6	増幅サイズ (bp)	検出限界
	91	100fg

## 【0270】

図9は、フラボバクテリウム属細菌の検出を示す電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー(100bpラダー)、レーン2は鋳型1ng、レーン3は鋳型10pg、レーン4は鋳型1pg、レーン5は鋳型100fg、レーン6は鋳型10fgの場合である。

## 【0271】

表6及び図9に示したように細菌の検出において、本発明の方法は有効であることを確認した。

## 【0272】

## 実施例9

本発明の増幅方法とハイブリダイゼーション法との組み合わせによる標的核酸の検出方法を検討した。ターゲットとして、腸管出血性大腸菌O-157を選択した。鋳型DNAは、実施例8(1)記載の方法で調製した。増幅断片長は、GC含量約40%で約100bpの領域を選び、プライマーとして配列表の配列番号51及び72記載の塩基配列で示されるVT2-IF20及びVT2-IR2

0-2プライマーを使用した。反応は、以下のように行った。すなわち、各50 pmolのVT2-IF20及びVT2-IR20-2プライマー、最終濃度0.01%プロピレンジアミンを含むアニーリング溶液、0~10<sup>4</sup>セル相当の各細胞数熱抽出液及び滅菌水で全液量10 $\mu$ lの混合液を調製した。該混合液をサーマルサイクラーパーソナル（宝酒造製）にて98℃ 2分間、熱変性後、55℃まで冷却し、1分間保持後、さらに氷上に置き、アニーリング処理を行った。

## 【0273】

アニーリング処理後、上記混合液に最終濃度20 mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝液（pH 7.8）、100 mM 酢酸カリウム、1% DMSO（ジメチルスルホキシド）、0.01% BSA（ウシ血清アルブミン）、4 mM 酢酸マグネシウム、各500 $\mu$ M dNTP混合物、30 UのE. coli RNase H及び5.5 UのBcaBEST DNA ポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を50 $\mu$ lにした。該反応液は、あらかじめ55℃に設定したサーマルサイクラーパーソナルにセットし、60分間保持した。対照として0-157 Typing Set（宝酒造製）を用い、マニュアル通りにサーマルサイクラーパーソナルにてPCRを行った。PCR条件は、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとする35サイクルで行った。該反応での所要時間は、1サイクルが約4分で、全所要時間は、約145分になる。この際、予想される増幅産物は、404 bpである。反応終了後、各反応液3 $\mu$ lを3%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に供した。その結果を図28Aに示す。図28Aは、ICAN法とPCR法での腸管出血性大腸菌O157ベロ毒素II型遺伝子検出の電気泳動結果であり、レーンM1は分子量マーカー（50-2000 bp）、レーンM2は分子量マーカー（100 bpラダー）、レーンNはネガティブコントロール、レーン1は1セル相当、レーン2は10セル相当、レーン3は10<sup>2</sup>セル相当、レーン4は10<sup>3</sup>セル相当、レーン5は10<sup>4</sup>セル相当の鑄型の場合である。さらに、1、10セルにおけるICAN法とPCR法の増幅量の比較結果を表7に示す。

## 【0274】

【表7】

	大腸菌O-157細胞数		
	0	1	10
ICAN法	—	+	+++
PCR法	—	+	++

—:増幅しない    +~+++ :増幅の程度を3段階で示す。

## 【0275】

図28A及び表7に示したように、本発明の検出方法もPCR法も予想される増幅産物を1細胞相当量の熱水抽出液を用いた反応系まで得ることができた。さらに、ICAN法で得られた増幅産物については、配列表の配列番号73記載の塩基配列で示される5'末端にビオチン標識されたVT2 オリゴヌクレオチドプローブを用いてドットハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズは以下の条件で行った。すなわち、98℃、5分間変性後、氷上にて急冷させた反応液1μlをHybond-N（アマシャム ファルマシア バイオテック社製）にスポットし、UV照射後、ハイブリバックに入れ、0.5M リン酸水素二ナトリウム（pH7.2）、1mM エチレンジアミン四酢酸、7%ラウリル硫酸ナトリウムのハイブリ溶液10mlを添加し、42℃でプレハイブリダイゼーションを30分間行なった。次に10μlの上記VT2 プローブ 100ng/μl溶液を熱変性後、プレハイブリダイゼーション反応系に添加した。42℃、60分間ハイブリダイゼーション後、66.6mM 塩化ナトリウム、66.6mM クエン酸三ナトリウム水和物、0.1%ラウリル硫酸ナトリウムの溶液で室温にて5分間2回洗浄し、洗浄バッファー（0.3M塩化ナトリウム、17.3mM リン酸二水素ナトリウム二水和物、2.5mM EDTA溶液、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム）6mlに5mg/mlのHorseradish peroxidase streptoavidin conjugate（PIERCE製）を2μl添加し、42℃、12分間インキュベート後、洗浄バッファーで、室温で2回洗浄した。その後、0.1M ク



エン酸バッファー (pH 5.0) 10 ml 室温で洗浄し、0.1 M クエン酸バッファー 5 ml、3% 過酸化水素 5  $\mu$ l、2 mg/ml テトラメチルベンジジンエタノール溶液 (TMB、ナカライ社製) 250  $\mu$ l の混合溶液で暗室にて約 10 分間反応させた。発色後、脱イオン水にて反応停止させた。その結果を図 28 B に示す。図 28 B は、ICAN 法での腸管出血性大腸菌 O-157 ペロ毒素 I 型遺伝子検出のドットハイブリ結果であり、上記電気泳動結果と同一であった。すなわち、本発明の方法の検出感度も PCR の検出感度も同等であることから、増幅反応の全所要時間を比較すると PCR に対し本発明の ICAN 法は、1/2 以下の時間で行えることができ、病原菌等の検出方法として有効であることを確認した。

## 【0276】

## 実施例 10

(1) 培養細胞由来 RNA を鋳型として、逆転写反応と本発明の方法の組み合わせを検討した。反応は、以下のように行った。すなわち、10% ウシ胎児血清 (ギブコ社製) 含有、ダルベッコ改良イーグル培地 (バイオウィタカー社製、12-604 F) に RAW 264.7 細胞 (ATCC TIB 71) を  $1.5 \times 10^5$ /ml になるように懸濁し、6 穴マイクロタイタープレートのウェルに 5 ml ずつ加えて 5% 炭酸ガス存在下、37°C で一晚培養した。各ウェルに 50  $\mu$ l の 100  $\mu$ g/ml のリポポリサッカライド (LPS、シグマ社製) 水溶液および 50  $\mu$ l の 1000 U/ $\mu$ l インターフェロン- $\gamma$  水溶液 (IFN- $\gamma$ 、ジェンザイムテクネ社製) を添加して 4 時間培養後、RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) を用いてキットの説明書に従い RNA を調製した。なお、陰性対照として LPS および IFN- $\gamma$  を添加しない区分を設定した。

## 【0277】

上記により調製した RNA 3  $\mu$ g と 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3)、50 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM dNTP 混合物、150 pmol のランダム 6mers プライマー、60 U のリボヌクレアーゼ インヒビター (宝酒造社製)、15 U の Reverse Transcriptase XL (AMV) (宝酒造社製、2620A) を含む全液量 60  $\mu$ l をサ

ーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9600、アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、30℃で10分間、続いて42℃で1時間保温した後、酵素を失活させるために99℃で5分間加熱してcDNAを調製した。

【0278】

マウス誘導型NO合成酵素 (iNOS) のmRNAの塩基配列 (GeneBank accession No. NM-010927) に従って、配列表の配列番号74及び75記載の塩基配列を有するプライマーを合成した。また、対照としてPCRのために配列表の配列番号76及び77記載のプライマーも合成した。

【0279】

各50 pmolの上記プライマーと2  $\mu$  lの0.05%プロピレンジアミン水溶液、鋳型として上記cDNA 1  $\mu$  l (RNAとして50 ng相当) 及び滅菌水で全液量10  $\mu$  lの混合液を調製した。該混合液は、サーマルサイクラーで98℃で2分間、熱変性後、55℃に冷却し、1分間保持して鋳型にプライマーをアニーリングさせた。

【0280】

アニーリング処理後、上記混合液に0.625 mM dNTP混合物、42.5 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液 (pH 8.5)、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% BSA (ウシ血清アルブミン)、1.25% DMSO (ジメチルスルホキシド)、15 UのE. coli RNase H、11 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む全液量40  $\mu$  lを加え、滅菌水で最終容量を50  $\mu$  lにした。該反応液は、サーマルサイクラーで55℃、1時間保持した。反応後のサンプルは分析するまで-20℃で凍結して保存した。対照のPCRは以下のように行った。すなわち、各50 pmolのプライマーとcDNA 1  $\mu$  l (RNAとして50 ng相当) を含む10×Ex Taqバッファー (宝酒造社製) 5  $\mu$  l、1.25 U タカラ Exタック DNAポリメラーゼ (宝酒造社製)、0.2 mM dNTP混合物を含む全液量50  $\mu$  lの反応液をサーマルサイクラーを用い、94℃ 2分間を1サイクル、次に94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとする30サイクル、さら

に72℃ 5分間の1サイクルのプログラムで反応を行った。反応後のサンプルは分析するまで-20℃で凍結して保存した。反応終了後、各反応液5 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図10に示す。

#### 【0281】

図10は、RT-ICAN法及びRT-PCR法の比較を示した電気泳動写真であり、レーン1は分子量マーカー（100bpラダー）、レーン2は陰性対照区分、レーン3はLPS、IFN- $\gamma$ 処理区分である。

#### 【0282】

図10に示したように、本発明の方法およびPCRのいずれの反応においても、LPSおよびIFN- $\gamma$ で処理した細胞より調製したcDNAを鋳型にした場合のみ増幅産物が確認された。従って、PCR法より反応所要時間が短い本発明の方法が、逆転写反応後のDNA増幅方法として有効であることを確認した。

#### 【0283】

##### 実施例11

E. coli RNase Hの至適温度は、37℃であることから、本発明の増幅反応中に失活していくことが考えられた。そこで、増幅反応の途中でE. coli RNase Hをさらに添加することによる増幅反応への影響を検討した。鋳型DNAは、カリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーター及びEPSPS遺伝子の挿入された組み換えダイズより抽出したゲノムDNAから配列表の配列番号78及び79記載のGMO-PCR-F及びGMO-PCR-Rプライマーを用いたPCRにより得られた増幅断片（1071bp）を使用した。また、配列表の配列番号80～83記載の塩基配列を有するプライマー、GMO-S1、S2、A1、A2を使用した。反応は、以下のように行った。すなわち、各50pmolの上記プライマー、最終濃度0.01%プロピレンジアミン、1pg～10ngの鋳型DNA及び滅菌水で全液量10 $\mu$ lの混合液を調製した。該混合液は、98℃、2分間熱変性し、55℃まで冷却し、アニーリング処理を行った。

#### 【0284】

アニーリング処理後、上記混合溶液に最終濃度各500 $\mu$ M dNTP混合物

、34 mM トリシン-水酸化カリウム緩衝液 (pH 8.7)、4.0 mM 酢酸マグネシウム、0.01% BSA (ウシ血清アルブミン)、1% DMSO (ジメチルスルホキシド)、30 U の *E. coli* RNase H、5.5 U の BcaBEST DNAポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を50  $\mu$ lにした。該反応液は、サーマルサイクラーで55℃で25分間保持した。反応開始から25分後に、さらに30 U の *E. coli* RNase Hを添加し、55℃で30分間保持した。対照として、55℃で55分間保持したものも調製した。反応終了後、反応液3  $\mu$ lを3%アガロース電気泳動に供した。その結果、いずれの鋳型DNA濃度でも、いずれのプライマーの組み合わせ、S1/A1、S1/A2、S2/A1、S2/A2においても*E. coli* RNase Hを反応途中で加えることにより増幅効率が改善されることを確認した。

【0285】

## 実施例12

本発明で使用する鋳型となる核酸を増幅あるいは複製する方法と、本発明の方法の組み合わせについて検討した。反応は以下のように行った。すなわち、実施例5(3)で調製した菊ウィロイド遺伝子を含み、大腸菌で複製したプラスミドを鋳型とし、T7 RNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を用いてインビトロトランスクリプション(in vitro transcription)を行い、RNA複製断片を得た。配列表の配列番号57及び58記載の塩基配列を有するプライマー及びcDNA シンセシスキット(宝酒造社製)を用いてcDNAを合成した。該cDNA断片及び上記複製プラスミドを鋳型として実施例5(3)記載の方法で増幅反応を行った。その結果、鋳型となる核酸をプラスミドの形で複製した場合及びRNAポリメラーゼでRNAを複製し、cDNAにした場合のいずれにおいても本発明の方法で利用できることを確認した。

【0286】

## 実施例13

## (1) プライマーの合成

マウス誘導型NO合成酵素(iNOS)のmRNAの塩基配列に従って、配列表の配列番号86～87記載のオリゴヌクレオチドプライマーNS1、NS2を

それぞれ合成した。

## (2) PCR産物を鋳型にしたICAN法によるDNA断片の増幅

前記各50 pmolの合成オリゴヌクレオチドプライマーと2  $\mu$ lの0.05%プロピレンジアミン水溶液、10 fg~10 pgの鋳型を含む全液量10  $\mu$ lをサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System9600、アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、98℃で2分間、続いて60℃で2分間の加熱処理を行い鋳型にプライマーをアニーリングさせた。なお、この際の鋳型は、iNOS cDNAを配列表の配列番号132及び133記載のプライマーNS-PCR1とプライマーNS-PCR2により増幅し(741bp)、Suprec02 (宝酒造社製) で精製したものをを用いた。上記熱処理をした各溶液に0.625mM dNTP混合液、40mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝溶液 (pH7.8)、125mM 酢酸カリウム、5.0mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、0.0156  $\mu$ gのPfu由来RNaseH、0.66UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む全液量40  $\mu$ lの反応液を添加し、サーマルサイクラーで60℃、1時間保温した。この反応液5  $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動により分析した。その結果を図11に示す。図11は、Pfu RNaseHを用いたICAN法の結果を示すものであり、レーン1は分子量マーカー(100bp)、レーン2は鋳型10fg、レーン3は鋳型100fg、レーン4は鋳型1pg、レーン5は鋳型10pgの場合である。

【0287】

図11に示したように、100fgの鋳型量まで目的の増幅産物が確認できた。

【0288】

### 実施例14

#### (1) RNAの調製

10%ウシ胎児血清 (ギブコ社製) 含有、ダルベッコ改良イーグル培地 (バイオウィタカー社製) にRAW264.7細胞 (ATCC TIB 71) を1.5  $\times 10^5$  /mlになるように懸濁し、6穴マイクロタイタープレートのウェルに

5 ml ずつ加えて5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。各ウェルに50  $\mu$ l の100  $\mu$ g/ml リポポリサッカライド (LPS、シグマ社製) 水溶液および50  $\mu$ l の1000 U/ml インターフェロン- $\gamma$  水溶液 (IFN- $\gamma$ 、ジェンザイムテクネ社製) を添加して4時間培養後、RNeasy Mini Kit (キアゲン社製、74104) を用いてキットの説明書に従いRNAを調製した。なお、陰性対照としてLPSおよびIFN- $\gamma$  を添加しない区分を設定した。

## 【0289】

上記により調製したRNA 3  $\mu$ g と10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3)、50 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM dNTP 混合液、150 pmol のRandom 6mers、60 U のRibonuclease Inhibitor (宝酒造社製)、15 U のReverse Transcriptase XL (AMV) (宝酒造社製) を含む全液量60  $\mu$ l をサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9600、アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、30℃で10分間、続いて42℃で1時間保温した後、酵素を失活させるために99℃で5分間加熱してcDNAを調製した。

## 【0290】

マウス誘導型NO合成酵素 (iNOS) のmRNAの塩基配列に従って、配列表の配列番号92～93に記載の塩基配列を有するプライマーNS5、NS6をそれぞれ合成した。また、PCR反応のために配列表の配列番号88～89記載のプライマーNS3、NS4を合成した。

## 【0291】

各50 pmol の上記プライマーNS5、NS6、鋳型として上記により合成したcDNA溶液1  $\mu$ l (RNAとして50 ng分) あるいは水により10倍、100倍、1000倍、10000倍希釈したもの1  $\mu$ l、および0.5 mM dNTP 混合液、32 mM ヘプス-水酸化カリウム緩衝溶液 (pH 7.8)、100 mM 酢酸カリウム、4.0 mM 酢酸マグネシウム、0.01%ウシ血清アルブミン、1%ジメチルスルホキシド、0.0156  $\mu$ g のPfu RNA

s e H、0.66 UのB c a B E S T DNAポリメラーゼを含む全液量50  $\mu$  lをサーマルサイクラーで60℃、1時間保温した。反応後のサンプルは分析するまで-20℃で凍結して保存した。

#### 【0292】

一方、対照としてPCR法を行った。各50 p m o lのプライマーNS3、NS4とcDNA溶液1  $\mu$  l (RNAとして50 n g分)あるいは水により10倍、100倍、1000倍、10000倍希釈したもの1  $\mu$  lと10×E x タックバッファー(宝酒造社製) 5  $\mu$  l、1.25 U タカラ E x タック ポリメラーゼ(宝酒造社製)、0.2 mM d N T P混合液を含む全液量50  $\mu$  lの反応系でサーマルサイクラーを用い、94℃ 2分間を1サイクル、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒のサイクルを35サイクル、72℃ 5分間を1サイクルのプログラムで反応を行った。反応後のサンプルは分析するまで-20℃で凍結して保存した。

#### 【0293】

上記ICAN反応液およびPCR反応液5  $\mu$  lを3.0%アガロースゲル電気泳動により分析した。その結果を図12に示す。すなわち、図12はP f u R N a s e Hを用いたICAN法及びPCR法でのi N O S遺伝子検出結果であり、レーン1は100 b p DNAラダーマーカー、レーン2は陰性対照cDNAの10000倍希釈サンプル、レーン3は陰性対照cDNAの1000倍希釈サンプル、レーン4は陰性対照cDNAの100倍希釈サンプル、レーン5は陰性対照cDNAの10倍希釈サンプル、レーン6は陰性対照cDNAの原液サンプル、レーン7はL P SとI F N -  $\gamma$ 区分cDNAの10000倍希釈サンプル、レーン8はL P SとI F N -  $\gamma$ 区分cDNAの1000倍希釈サンプル、レーン9はL P SとI F N -  $\gamma$ 区分cDNAの100倍希釈サンプル、レーン10はL P SとI F N -  $\gamma$ 区分cDNAの10倍希釈サンプル、レーン11はL P SとI F N -  $\gamma$ 区分cDNAの原液サンプルの場合である。

#### 【0294】

図12に示したように、ICANおよびPCRのいずれの反応においても、L P SおよびI F N -  $\gamma$ で処理した細胞より調製したcDNAを鋳型にした場合の

み増幅産物が確認された。I C A N 反応においては1 0 0 0 倍希釈したc D N A まで増幅産物の増加が確認された。P C R 反応においては1 0 0 倍希釈したc D N A まで増幅産物の増加が確認された。

【0 2 9 5】

#### 実施例 1 5

(1)  $\lambda$  D N A の塩基配列に従って、配列表の配列番号 9 0 ~ 9 1 記載のオリゴヌクレオチドプライマー 4 とオリゴヌクレオチドプライマー 5 を合成した。オリゴヌクレオチドプライマー 4 は G C 含量 7 5 % のセンス方向のプライマーであり、オリゴヌクレオチドプライマー 5 は G C 含量 8 0 % のアンチセンス方向のプライマーである。

【0 2 9 6】

各 1 2 0 p m o l の上記プライマー 4 と 5 に 2  $\mu$  l の 0 . 0 5 % プロピレンジアミン溶液と、1 0 n g の鋳型を含む全液量 1 0  $\mu$  l の反応系で 9 8  $^{\circ}$ C で 2 分間、熱変性させた後、氷中で急冷することによりプライマーを鋳型にアニールさせた。なお、この際の鋳型は、実施例 2 記載の P C R 反応物 ( 1 0 0 5 b p ) を S u p r e c o 2 で精製したものをを用いた。

【0 2 9 7】

(2) アニール後に各 0 . 6 2 5 m M の d N T P 混合液、4 2 . 5 m M ビシナー水酸化カリウム緩衝液 ( p H 8 . 3 ) 、 5 . 0 m M 酢酸マグネシウム、0 . 0 1 2 5 % ウシ血清アルブミン、1 . 2 5 % ジメチルスルホキシド、0 . 5  $\mu$  l の *Thermotoga maritima* R N a s e H I I ( 0 . 5 8  $\mu$  g / m l ) 及び B c a B E S T D N A ポリメラーゼを 2 . 2 U 含む 4 0  $\mu$  l を添加し、I C A N 反応を 6 0  $^{\circ}$ C 、 6 5  $^{\circ}$ C 、 7 0  $^{\circ}$ C で 1 時間行なった。この I C A N 反応後の反応液 3  $\mu$  l を 3 . 0 % アガロースゲル電気泳動で確認した。その結果を図 1 3 に示す。図 1 3 は、*Thermotoga maritima* R N a s e H I I を用いた I C A N 法の結果を示すものであり、レーン 1 は分子量マーカー ( 1 0 0 b p ) 、レーン 2 は反応温度 6 0  $^{\circ}$ C 、レーン 3 は反応温度 6 5  $^{\circ}$ C 、レーン 4 は反応温度 7 0  $^{\circ}$ C の場合である。

【0 2 9 8】



図 1 3 に示した様に、いずれの反応温度においても目的の増幅産物が確認できた。

## 【 0 2 9 9 】

## 実施例 1 6

(1) PCR 産物を鋳型にした ICAN 法による DNA 断片の増幅 (アルカリ変性) について検討した。10 fg ~ 10 pg の鋳型 1  $\mu$  l と 0.4 N NaOH 1  $\mu$  l を混合し、37℃で5分間保温し鋳型の変性を行った。なお、この際の鋳型は、iNOS cDNA を実施例 1 3 記載の PCR 増幅断片 (741 bp) を Suprec 02 (宝酒造社製) で精製したものをを用いた。上記変性した各鋳型を 0.4 N HCl 1  $\mu$  l により中和し、続いてこれに前記各 50 pmol の NS1 及び NS2 プライマーと、0.5 mM の dNTP 混合液、32 mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝溶液 (pH 7.8)、100 mM 酢酸カリウム、4.0 mM 酢酸マグネシウム、0.01% ウシ血清アルブミン、1.0% ジメチルスルホキシド、0.0156  $\mu$  g の Pfu RNase H、0.66 U の BcaBEST DNA ポリメラーゼを含む全液量 47  $\mu$  l の反応液を添加し、サーマルサイクラーで 60℃、1 時間保温した。この反応液 5  $\mu$  l を 3.0% アガロースゲル電気泳動により分析した。その結果を図 1 4 に示す。図 1 4 は、アルカリ変性した鋳型を用いた ICAN 法の結果を示すものであり、レーン 1 は分子量マーカー (100 bp)、レーン 2 は鋳型 10 fg、レーン 3 は鋳型 100 fg、レーン 4 は鋳型 1 pg、レーン 5 は鋳型 10 pg の場合である。

## 【 0 3 0 0 】

図 1 4 に示した様に、1 pg の鋳型量まで明らかな増幅産物の増加が確認できた。

## 【 0 3 0 1 】

## 実施例 1 7

(1) 鋳型の変性を伴わない ICAN 法による DNA 断片の増幅について検討した。プライマーは、配列表の配列番号 92 ~ 93 に示す NS5 及び NS6 プライマーを使用した。鋳型 DNA は、実施例 1 3 で調製したものをを使用した。

鋳型 10 fg ~ 100 pg あるいは陰性対照の水、各 50 pmol の NS5 お

よびNS6プライマー、0.5mM dNTP混合液、32mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝溶液 (pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、4.0mM 酢酸マグネシウム、0.01%ウシ血清アルブミン、1.0%ジメチルスルホキシド、0.0156 $\mu$ gのPfu RNaseH、1UのBcaBEST DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を含む全液量50 $\mu$ lの反応液をサーマルサイクラーで60℃、1時間保温した。反応終了後、この反応液5 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動により分析した。その電気泳動写真を図15に示す。図15は、鋳型DNA変性工程のない場合の本発明の増幅方法についての電気泳動写真であり、レーン1は100bp DNAラダーマーカー、レーン2は陰性対照 (水) の場合、レーン3は鋳型10fgの場合、レーン4は鋳型100fgの場合、レーン5は鋳型1pgの場合、レーン6は鋳型10pgの場合、レーン7は鋳型100pgの場合である。

## 【0302】

図15に示したように、1pgの鋳型量まで、目的の増幅産物が確認できた。

## 【0303】

## 実施例18

(1) ベクタープラスミドpDON-AI DNA (宝酒造社製) のパッケージング領域の塩基配列に従って、配列表の配列番号94及び95記載のpDON-AI-1、pDON-AI-2プライマーをそれぞれ合成した。

(2) 鋳型の変性を伴わないICAN法によるDNA断片の増幅

10fg~1ngのpDON-AI DNA 1 $\mu$ lあるいは陰性対照の水1 $\mu$ l、前記各50pmolのプライマー、0.5mM dNTP混合液、32mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝溶液 (pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、4.0mM 酢酸マグネシウム、0.01%ウシ血清アルブミン、1.0%ジメチルスルホキシド、参考例4で調製した0.0156 $\mu$ gのPfu RNaseH、1UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む全液量50 $\mu$ lの反応液をサーマルサイクラーで60℃、1時間保温した。この反応液5 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動により分析した。その結果を図16に示す。図16は、環状2本鎖DNAを変性処理なしで鋳型とした場合の本発明の方法につい

での電気泳動写真であり、レーン1は100bp DNAラダーマーカー、レーン2は陰性対照(水)、レーン3は鋳型1.0fg、レーン4は鋳型100fg、レーン5は鋳型1pg、レーン6は鋳型10pg、レーン7は鋳型100pg、レーン8は鋳型1ngの場合である。

【0304】

図16に示すように、10fgの鋳型量まで目的とする増幅断片が得られることを確認した。

【0305】

実施例19

本発明の方法を利用したヒトパピローマウイルス16型遺伝子の検出について検討した。鋳型として、ヒトパピローマウイルス16型の感染している細胞であるCaSki cell(大日本製薬社製、cellあたり500コピーのヒトパピローマウイルス16型を保有している)のDNAを用いた。HPV16検出用プライマーとして、配列表の配列番号96~97記載の塩基配列を有するHPV16 S3プライマー及びHPV16 A2プライマーを使用した。該プライマー対で得られる増幅産物は、約120bpである。反応は、以下のように行った。

上記鋳型DNAを1pg、3pg、30pg、100pg、300pg、1ng、3ngあるいは10ng、各50pmolのHPV16 S3プライマー及びHPV16 A2プライマー、最終濃度0.01%プロピレンジアミンを含む混合液10 $\mu$ lを調製した。この混合液をサーマルサイクラーパーソナルにて98℃ 2分間、55℃ 1分間保温後、氷上に置いた。該混合液に、最終濃度20mM ヘプスー水酸化カリウムバッファー(pH7.8)、100mM 酢酸カリウム、1% ジメチルスルホキシド、0.01% ウシ血清アルブミン、4mM 酢酸マグネシウム、各500 $\mu$ M dNTP混合液、30U大腸菌由来RNaseH、5.5UのBcaBEST DNAポリメラーゼを添加し最終容量を50 $\mu$ lとした。この反応液を、あらかじめ55℃に設定したサーマルサイクラーにセットし、60分間反応させた。対照として、Human Papillomavirus Primers HPVp16(forward, reve

rise) (宝酒造社製) を用い、マニュアルに記載の方法に従い、サーマルサイクラーパーソナルにてPCRを行った。この際、予想される増幅産物は、140bpである。

#### 【0306】

反応終了後、各反応液3 $\mu$ lを4%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に供した。その結果を図17Aに示す。すなわち、図17AはICAN法とPCR法を利用したHPV16遺伝子の検出結果であり、レーンM1は分子量マーカ(100bpラダー)、レーンM2は分子量マーカ(50-2000bp)、レーン1は鋳型無し、レーン2は鋳型1pg、レーン3は鋳型3pg、レーン4は鋳型30pg、レーン5は鋳型100pg、レーン6は鋳型300pg、レーン7は鋳型1ng、レーン8は鋳型3ng、レーン8は鋳型3ng、レーン9は鋳型10ngの場合である。

#### 【0307】

図17Aに示したように、ICAN反応では鋳型DNA3pgを用いた反応まで、PCR反応では鋳型DNA1pgの場合まで予想される増幅産物が得られることが確認できた。

#### 【0308】

さらに、これらの反応産物について、配列表の配列番号98に記載の塩基配列で示されるオリゴヌクレオチドHPV16プローブを用いてドットハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、実施例9記載の条件で行った。その結果を図17Bに示す。すなわち、図17BはPCR法とICAN法でのHPV16遺伝子のドットハイブリ検出の結果であり、レーン1は鋳型無し、レーン2は鋳型1pg、レーン3は鋳型3pg、レーン4は鋳型30pg、レーン5は鋳型100pg、レーン6は鋳型300pg、レーン7は鋳型1ng、レーン8は鋳型3ng、レーン8は鋳型3ng、レーン9は鋳型10ngの場合である。

#### 【0309】

図17Bに示したようにICAN法及びPCR法のいずれにおいても検出感度はほぼ同等であることから、ウィルス等の検出方法として有効であることが確認

できた。

【0310】

#### 実施例 20

臨床検体DNAサンプルからのヒトパピローマウイルス16型遺伝子検出について検討した。鋳型として、インフォームドコンセントの得られた臨床検体6検体から常法で調製されたDNAを用いた。この臨床検体から調製されたサンプルは、PCRにより感染HPVのタイプが判明しているものである。検出用プライマーは、実施例19記載のHPV16 S3プライマー及びHPV16 A2プライマーを用いた。鋳型となる臨床検体からのDNAサンプルはTEバッファーにより1 $\mu$ lあたり100ngとなるように調製して使用した。鋳型量以外は、実施例19記載の反応液組成及び反応条件で行った。さらに、ネガティブコントロールとして鋳型DNAを加えないもの、ポジティブコントロールとしてHPV16の感染している細胞であるCaSki cell DNA 500pgを用い、同様の反応を行った。反応終了後、各反応液3 $\mu$ lを4%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に供した。その結果を図18Aに示す。すなわち、図18Aは臨床検体からのHPV16遺伝子検出の結果であり、レーンMは分子量マーカー、レーン1~6は臨床検体、レーン7はネガティブコントロール、レーン8はポジティブコントロールの場合である。

【0311】

図18Aに示したように、従来法のPCR法によりHPV16型感染と判明しているサンプルにおいて、ICAN法でも約120bpの増幅産物が認められ、その他の型のHPVが感染しているサンプルおよび非感染サンプルでは増幅は認められなかった。

【0312】

さらに、これらの増幅産物について、実施例9記載のドットハイブリを行った。その結果を図18B及び表8に示す。すなわち、図18Bは、臨床検体からのHPV16遺伝子のドットハイブリ検出結果であり、レーン1~6は臨床検体、レーン7はネガティブコントロール、レーン8はポジティブコントロールの場合である。

## 【0313】

図18に示したように電気泳動で得られた結果と同じ結果が得られ、電気泳動的にもドットハイブリ的にPCR法と同様の結果が得られることを確認した。すなわち、本発明の方法により、実際の臨床検体からHPV16型を検出でき、ウイルス等の検出方法として有効であることを確認した。

## 【0314】

【表8】

サンプル	No.3	No.4	No.6	No.7	No.8	No.9	鋳型未添	ポジティ
							加	ブコント
								ロール
PCR によるタ イピング	非感染	非感染	Type18	Type16	Type67	Type16	*	*
HPV16 検出ブ ライマーによる ICAN増幅	-	-	-	+	-	+	-	+

-: 増幅なし、+: 増幅確認

## 【0315】

## 実施例21

臨床検体からのHCVの検出について検討した。検体試料は、インフォームドコンセントの得られたHCV患者の血清5検体各々300 $\mu$ lからトライゾール試薬（ライフテック社製）を使用して該試薬添付の説明書に従い調製し、最終的に注射用水（大塚製薬製）6 $\mu$ lに溶かしRNAサンプルとした。陰性コントロールとして健常者の血清300 $\mu$ lから同様に抽出したRNAをおいた。まず、RNA PCR kit (AMV) ver 2.1（宝酒造製）を用いて、逆転写反応液として1 $\times$ RNA PCR Buffer、5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM dNTPs、1U AMV Reverse Transcriptase XL、配列表の配列番号99～100に記載のHCV-Fプライマー及びH

CV-Rプライマーを各10 pmol及び各RNAサンプル2  $\mu$ lを含む4  $\mu$ lの反応液を調製し、30℃、10分間加温後、50℃で30分間反応させた。逆転写反応終了後、ICAN反応を行った。ICAN反応では、配列表の配列番号101～102記載の塩基配列を有するHCV-F2プライマー及びHCV-R1プライマーを使用した。反応は以下のようにして行った。

## 【0316】

上記プライマー各50 pmol、各逆転写反応液3  $\mu$ l、最終濃度0.01%プロピレンジアミンを含む全液量10  $\mu$ lの混合液を調製した。また、ブランクとして滅菌水3  $\mu$ lを用いた。該混合液をサーマルサイクラーパーソナルで98℃、2分間熱処理後、60℃まで急冷し1分間保持後、氷上に保存した。

アニーリング処理後、上記混合液に最終濃度が20 mM ヘプス-水酸化カリウムバッファー (pH 7.8)、100 mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.01%ウシ血清アルブミン、4 mM 酢酸マグネシウム、各500  $\mu$ M dNTPs、30 Uの大腸菌由来RNase H及び5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを添加し滅菌水で最終容量を50  $\mu$ lにした。該反応液をあらかじめ、60℃に設定したサーマルサイクラーMPにセットし60分間反応させた。反応終了後、各反応液3  $\mu$ lを3%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に供した。その結果を図19Aに示す。すなわち、図19Aは、臨床検体からのHCV検出の結果を示すものであり、レーンBは滅菌水を鋳型にした場合、レーン1は健常人試料、レーン2～6はHCV患者試料、レーンMは分子量マーカー (50～2000 bp) である。

## 【0317】

図19Aに示したように、HCV患者由来のRNAサンプルのみ、HCVゲノムの塩基配列から予想される約107 bpの増幅産物が得られ、健常人由来の血清及びブランクは、上記増幅産物は得られなかった。さらに実施例9記載の条件で、配列表の配列番号103記載の5'末端をビオチン化したHCVプローブを使用して、ICAN増幅産物についてドットハイブリダイゼーションを行った。その結果を図19Bに示す。図19Bにおいて、各レーンのサンプルは、電気泳動写真の場合と同じである。

## 【0318】

図19に示したように、電気泳動結果とドットハイブリ結果とは一致することが確認できた。このことから、本発明の方法により実際の臨床検体からHCVを検出することができ、ウイルス等の検出方法として有効であることが確認できた。

## 【0319】

## 実施例22

アデノウイルスの検出方法について検討した。

ジーンバンク登録番号 (ACC No. J01917) 記載のアデノウイルスの塩基配列に従って、配列表の配列番号104～106記載のE1A (腫瘍遺伝子) 増幅用プライマーE1A-1 (センス方向)、E1A-2 (アンチセンス方向)、E1A-3 (アンチセンス方向) を構築した。アデノウイルスは、ATCC登録番号VR-5を使用した。鑄型は、以下のように調製した。 $8.73 \times 10^{10}$  PFU/mlのアデノウイルス溶液100  $\mu$ lを終濃度0.1% SDS-0.2 mg/ml プロテイナーゼK溶液で37℃、1時間インキュベートし、その後シリカゲルによりDNAを吸着させ、精製した。これを滅菌水にて希釈し、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  PFUに相当するアデノウイルスDNAを調製したものを使用した。反応は、以下のようにして行った。すなわち、各60 pmolのE1A-1プライマー及びE1A-2プライマー (増幅鎖長112 bp) あるいはE1A-1プライマー及びE1A-3プライマー (増幅鎖長91 bp) の組み合わせに、2  $\mu$ lの0.05% プロピレンジアミンと鑄型を含む全液量10  $\mu$ lの反応系で98℃で2分間、熱変性させた後、水中で急冷することによりプライマーを鑄型にアニールさせた。

## 【0320】

アニーリング処理後に各0.625 mM dNTP混合液、42.5 mM トリシン-水酸化カリウム (pH 8.5) 緩衝液、5.0 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% ウシ血清アルブミン、1.25% ジメチルスルホキシド、30 Uの大腸菌由来RNase H及び5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む40  $\mu$ lを添加し、最終容量を50  $\mu$ lにした。該反応液を60℃で1



時間保持した。また対照として、上記と同じ鑄型と配列表の配列番号107～108及び142記載の塩基配列を有するE1A（腫瘍遺伝子）PCR増幅用プライマーE1A-1P（センス方向）、E1A-2P（アンチセンス方向）、E1A-3P（アンチセンス方向）を構築した。プライマーを用いて、PCRによる検出を行なった。PCRは以下のようにして行った。すなわち、各60 pmolのE1A-1Pプライマー及びE1A-2Pプライマー（増幅鎖長112 bp）あるいはE1A-1Pプライマー及びE1A-3Pプライマー（増幅鎖長91 bp）の組み合わせに、10×Ex Taqバッファー（宝酒造社製）5  $\mu$ l、1.25 UのタカラEx Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）、0.2 mM dNTPsを含む全量50  $\mu$ lのPCR溶液を調製した。PCR条件は94℃、30秒、55℃、30秒、72℃、30秒を1サイクルとした30サイクルで行なった。

反応終了後、ICAN法、PCR法の両反応液3  $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図20及び表9に示す。すなわち、図20は、アデノウイルス粒子からのウイルスE1A遺伝子の検出結果を示すものであり、レーン1～レーン10までがプライマーE1A-1及びE1A-2の組み合わせに関する結果であり、レーン11～20までがプライマーE1A-1及びE1A-3の組み合わせに関する結果である。レーン1は分子量マーカー（100 bpラダー）、レーン2はICAN法で $10^6$ （PFU相当DNA）、レーン3はICAN法で $10^5$ 、レーン4はICAN法で $10^4$ 、レーン5はICAN法で $10^3$ 、レーン6は分子量マーカー（100 bpラダー）、レーン7はPCR法で $10^6$ （PFU相当DNA）、レーン8はPCR法で $10^5$ 、レーン9はPCR法で $10^4$ 、レーン10はPCR法で $10^3$ の場合である。さらに、レーン11は分子量マーカー（100 bpラダー）、レーン12はICAN法で $10^6$ （PFU相当DNA）、レーン13はICAN法で $10^5$ 、レーン14はICAN法で $10^4$ 、レーン15はICAN法で $10^3$ 、レーン16は分子量マーカー（100 bpラダー）、レーン17はPCR法で $10^6$ （PFU相当DNA）、レーン18はPCR法で $10^5$ 、レーン19はPCR法で $10^4$ 、レーン20はPCR法で $10^3$ の場合である。

【0321】

【表9】

表9

増幅サイズ (bp)	検出限界	
	ICAN法	PCR法
112	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
91	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>

【0322】

図20及び表9に示すようにアデノウイルスE1A遺伝子の検出においてICAN法はPCR法と同等の検出感度であることを確認した。

【0323】

## 実施例23

レトロウイルスベクター感染細胞からの組み込みウイルス遺伝子の検出について検討した。レトロウイルス感染細胞の調製およびゲノムDNA調製法は以下のように行った。すなわち、ベクタープラスミドpDON-AI（宝酒造社）をパッケージング細胞GPE+86にリン酸カルシウム法にて導入し、導入細胞の培養上清からエコトロピックベクターを調製した。NIH/3T3細胞に、エコトロピックベクターを感染させ、G418を含む培地で14日間培養することによりウイルスベクター感染細胞を調製した。調製したレトロウイルス感染細胞  $4 \times 10^4$  個より常法によりレトロウイルス感染細胞のゲノムDNA  $27 \mu\text{g}$  を得た。また、プライマーは、実施例18(1)記載のプライマーpDON-AI-1及びpDON-AI-2を用いた。反応は以下のように行った。すなわち、前記各60 pmolのプライマー、 $2 \mu\text{l}$ の0.25%プロピレンジアミン水溶液、上記鋳型ゲノムDNA  $1000 \text{ ng} \sim 0.1 \text{ ng}$ を含む全液量  $10 \mu\text{l}$ の反応系でサーマルサイクラー（宝酒造社製）で98℃で2分間の後、60℃の加熱処理により鋳型にプライマーをアニーリングさせた。

【0324】

上記アニーリング処理後の各溶液に0.625 mM dNTP混合液、40 m

M ヘプスー水酸化カリウム緩衝溶液 (pH 7.8)、125 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% ウシ血清アルブミン、1.25% ジメチルスルホキシド、30 U の大腸菌由来 RNase H 及び、5.5 U の BcaBest DNA ポリメラーゼを含む全液量 40  $\mu$ l の反応液を添加し、最終容量を 50  $\mu$ l にした。該反応液をサーマルサイクラーで 60℃ で 1 時間保持した。反応終了後、該反応液 5  $\mu$ l を 3.0% アガロースゲル電気泳動に供した。さらに ICAN 法と PCR 法による DNA の検出感度を比較するために、配列表の配列番号 111~112 記載の pDON-AI-3 及び pDON-AI-4 プライマーを使用して PCR を行った。PCR は、上記鑄型 100 ng~0.1 ng、上記各プライマー 60 pmol、10 $\times$ ExTaq バッファー 5  $\mu$ l、1.25 U のタカラ Ex タックポリメラーゼ、0.2 mM dNTPs を含む全量 50  $\mu$ l の反応液を調製し、サーマルサイクラーパーソナルを用い、94℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 1 サイクルとした反応を 35 サイクル行った。反応終了後、該反応液 5  $\mu$ l を 3.0% アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図 21 に示す。すなわち、図 21 は、ICAN 法及び PCR 法でのレトロウイルスベクター感染細胞からの組み込みウイルス遺伝子の検出結果を示すものであり、レーン 1 は分子量マーカー (100 bp ラダー)、レーン 2 は鑄型 1000 ng、レーン 3 は鑄型 100 ng、レーン 4 は鑄型 10 ng、レーン 5 は鑄型 1 ng、レーン 6 は鑄型 0.1 ng の場合である。

## 【0325】

図 21 に示したように ICAN 法では、鑄型 DNA が 1 ng まで、PCR 法では 35 サイクルで鑄型 1 ng まで目的の増幅産物を確認できた。

## 【0326】

## 実施例 24

大腸菌 O-157 ベロ毒素 I 型遺伝子の検出について、本発明の増幅方法とハイブリダイゼーション法との組み合わせによる標的核酸の検出方法を検討した。ターゲットとして、腸管出血性大腸菌 O-157 ベロ毒素 I 型遺伝子を選択した。鑄型 DNA は、実施例 8 (1) 記載の方法で調製した。増幅領域は、GC 含量約 40% で約 80 bp の領域を選び、プライマーとして配列表の配列番号 1

13及び114記載の塩基配列で示されるVT1-IF4及びVT1-IR1プライマーを使用した。反応は、以下のように行った。すなわち、各60 pmolのVT1-IF4及びVT1-IR1プライマー、最終濃度0.01%プロピレンジアミン、 $0\sim 10^5$ セル相当の各細胞数熱抽出液及び滅菌水で全液量5  $\mu$ lの混合液を調製した。該混合液をサーマルサイクラーパーソナルにて98℃2分間、熱変性後、55℃まで急冷し、1分間保持後、さらに氷上に置き、アニーリング処理を行った。

## 【0327】

アニーリング処理後、上記混合液に最終濃度20 mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝液 (pH 7.8)、100 mM 酢酸カリウム、1%ジメチルスルホキシド、0.01%ウシ血清アルブミン、4 mM 酢酸マグネシウム、各500  $\mu$ M dNTPs、15 Uの大腸菌由来RNase H及び2.75 UのBcaBEST DNA ポリメラーゼを添加し、滅菌水で最終容量を25  $\mu$ lにした。該反応液は、あらかじめ55℃に設定したサーマルサイクラーパーソナルにセットし60分間保持した。対照として上記熱抽出液についてO-157 Typing Set (宝酒造製)を用い、マニュアル通りにサーマルサイクラーパーソナルにてPCRを行った。PCR条件は、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとする35サイクルで行った。該反応での所要時間は、約145分になる。この際、予想される増幅産物は、349 bpである。反応終了後、各反応液3  $\mu$ lを3%ヌシーブ3:1アガロース電気泳動に供した。ICAN法の結果を図22に示した。図22は、O-157ペロ毒素I型遺伝子の検出結果であり、レーンMは分子量マーカー (50-2000 bp)、レーンNは、滅菌水を鋳型にした場合、レーン1は1セル相当の鋳型、レーン2は10セル相当の鋳型、レーン3は $10^2$ セル相当の鋳型、レーン4は $10^3$ セル相当の鋳型の場合である。さらに、ICAN法とPCR法の検出結果について表10に示す。

## 【0328】

【表 10】

	大腸菌 O-157 細胞数		
	0	1	10
ICAN法	-	+	+++
PCR法	-	+	++

- : 増幅しない、+ ~ +++ : 増幅量を3段階で示した

## 【0329】

表 10 に示したように、ICAN 法も PCR 法も予想される増幅産物を 1 細胞相当量の熱抽出液を用いた反応系まで得ることができた。さらに、増幅産物については、配列表の配列番号 115 に記載の塩基配列で示される 5' 末端がビオチン標識された VT1 オリゴヌクレオチドプローブを用いてドットハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズは実施例 19 記載の条件で行った。その結果は、上記電気泳動結果と同一であった。すなわち、ICAN 法と PCR 法の検出感度は同等であることが確認できた。さらに増幅反応の全所要時間を比較すると PCR に対し本発明の ICAN 法は 1/2 以下の時間で行うことができ、病原菌などの検出方法として有効であることを確認した。

## 【0330】

## 実施例 25

ボツリヌス A 型毒素遺伝子の検出方法について検討した。鑄型は、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*、食中毒事例株、type A-190) より調製した DNA を用いた。該菌株は女子栄養大学・衛生学教室保存菌株である。検出用プライマーとして、配列表の配列番号 116 ~ 117 記載の塩基配列で示される BotA S2 プライマー) 及び BotA A2 プライマーを合成した。該プライマー対で約 150 bp の増幅産物が得られる。鑄型となる上記 A 型毒素産生ボツリヌス菌 DNA は、滅菌水にて 1  $\mu$  l あたり 100 fg、1 pg、10 pg、100 pg となるように調製した。反応は以下のようにして行った。

## 【0331】

各50 pmolの上記プライマー、最終濃度0.01%プロピレンジアミン、上記鋳型DNA溶液各1  $\mu$ lを添加し、容量10  $\mu$ lの混合液を調製した。該混合液を実施例19記載の反応液組成及び反応条件でICAN反応を行った。対照として、ボツリヌスA型毒素遺伝子検出用プライマーセット BAS-1 and BAS-2（宝酒造社製）を用い、マニュアルに記載の方法に従い、サーマルサイクラーパーソナルにてPCRを行った。この際、予想される増幅産物は、284 bpである。

## 【0332】

反応終了後、各反応液3  $\mu$ lを4%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に供した。その結果を図23Aに示す。すなわち、図23Aは、ICAN法及びPCR法でのボツリヌスA型毒素遺伝子の検出結果を示すものであり、レーンM1は分子量マーカー（100 bpラダー）、レーンM2は分子量マーカー（50~2000 bpマーカー）、レーン1は鋳型なし、レーン2は鋳型100 fg、レーン3は鋳型10 pg、レーン4は鋳型100 pgの場合である。

## 【0333】

図23Aに示すように、ICAN法では鋳型DNA100 fgを用いた反応まで、予想される増幅産物が得られたが、PCR法では鋳型DNA100 fgを用いた反応では予想される増幅産物が得られなかった。さらに、これらの反応産物について、配列表の配列番号118に記載の塩基配列で示されるBotAプローブを用いてドットハイブリダイゼーションを行った。ドットハイブリは、実施例9記載の条件と同様にして行った。その結果を図23Bに示す。図23Bに示したように、ICAN反応では鋳型100 fgまで、PCR反応では鋳型10 pgまでシグナルが確認でき、上記電気泳動結果と一致することが確認できた。

## 【0334】

## 実施例26

菊ウィロイドの検出について検討した。特願平9-140383公報 実施例1に記載の、キクわい化ウィロイド(CSVd)感染キクからの低分子RNAの抽出法に従って得た低分子RNAの10倍希釈系列を調製した。逆転写反応は、

RNA PCR kit (AMV) ver 2.1 (宝酒造社製) を用いて行った。すなわち、逆転写反応液として、 $1\times$ RNA PCR Buffer、5mM  $MgCl_2$ 、1mM dNTPs、20UのRNase Inhibitor、5U AMV Reverse Transcriptase XL、50 pmol Random 9mers、各希釈系列RNA溶液 $1\mu l$ を用いて $20\mu l$ の反応液を調製し、 $30^\circ C$  10分間加温後、 $55^\circ C$  30分間反応させた。反応終了後、 $99^\circ C$  5分間熱処理により逆転写酵素を失活させ、冷却後、ICAN反応を行った。ICAN反応液 $50\mu l$ の反応系に対して上記逆転写反応液 $1\mu l$ を鋳型として用いた。本実施例においてプライマーは、配列表の配列番号119及び120記載の塩基配列を有するCSVD-F4プライマーとCSVD-R3プライマーを使用した。反応は、反応温度を $60^\circ C$ 、サーマルサイクラーMPを使用する以外は、実施例19記載の反応条件と同じにした。反応終了後、各反応液 $3\mu l$ を3%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に供した。

## 【0335】

一方、同じ逆転写反応液 $1\mu l$ を鋳型として用いて $50\mu l$ の反応系でPCR増幅を行った。このとき使用したプライマーは配列表の配列番号109及び110記載のF94とR264プライマーを使用した。反応は以下のように行った。すなわち、TaKaRa PCR Amplification kitを使用し、プロトコールに従い、反応液を調製し、上記プライマー各10 pmol用いて、各逆転写反応液 $1\mu l$ を添加して全量 $50\mu l$ にし、サーマルサイクラーMPにより増幅反応をおこなった。反応条件は、 $94^\circ C$  30秒、 $55^\circ C$  30秒、 $72^\circ C$  30秒を1サイクルとし30サイクルをおこなった。反応終了後、各反応液 $5\mu l$ を3%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に供した。その結果を表11に示す。

## 【0336】

【表 1 1】

表 1 1

鋳型RNAの希釈率	$\times 10^2$	$\times 10^3$
RT-ICAN	++	+
RT-PCR	+	-

- : 増幅していない、+ : 増幅している、++ : 良く増幅している

## 【0337】

表 1 1 に示したように、ICAN 法では  $10^3$  倍に希釈した RNA サンプルを鋳型に用いた反応まで、PCR 法では  $10^2$  倍に希釈した RNA サンプルを鋳型に用いた反応まで増幅産物が得られた。

## 【0338】

さらに ICAN 増幅産物と PCR 増幅産物についてドットハイブリダイゼーションにより目的の産物であることを確認した。配列表の配列番号 121 記載の塩基配列で示される 5' 末端にビオチン標識された CSV D プローブを用いてドットハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズの方法は実施例 9 に記載の条件に従った。その結果は、上記電気泳動結果と一致しており、ICAN では  $10^3$  倍希釈の RNA サンプルまでシグナルが得られ、PCR では  $10^2$  倍希釈の RNA サンプルまでシグナルが得られた。PCR に比べて ICAN の方が感度がよいことが示された。

## 【0339】

## 実施例 27

Pfu RNase H を用いたキクわい化ウイロイド (CSV d) 感染キクからのウイロイド遺伝子の検出について検討した。実施例 26 で調製した RNA の 10 倍希釈液  $3 \mu\text{l}$  と 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3)、50 mM 塩化カリウム、5 mM 塩化マグネシウム、1 mM dNTP 混合液、150 pmol の Random 6mers、60 U の Ribonuclease Inhibitor (宝酒造社製)、15 U の Reverse Transcriptase XL (AMV) (宝酒造社製) を含む全液量  $60 \mu\text{l}$  をサーマルサ



イクラー (GeneAmp PCR System9600, アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、30℃で10分間、続いて42℃で1時間保温した後、酵素を失活させるために99℃で5分間加熱してcDNAを調製した。次に、ウィロイドのmRNAの塩基配列に従って、配列表の配列番号122～125記載のプライマーVd1、Vd2、Vd3、Vd4を合成した。

## 【0340】

各50 pmolの上記プライマーVd1、Vd2と鋳型として上記により合成したcDNA溶液1  $\mu$  lあるいは水により10倍、100倍、1000倍、10000倍希釈したもの1  $\mu$  l、または陰性対照として水1  $\mu$  lと0.5 mM dNTP混合液、32 mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝溶液 (pH7.8)、100 mM 酢酸カリウム、4.0 mM 酢酸マグネシウム、0.01%ウシ血清アルブミン、1%ジメチルスルホキシド、0.0156  $\mu$  gのPfu RNase H、1 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む全液量50  $\mu$  lをサーマルサイクラーで57℃、1時間保温した。反応後のサンプルは分析するまで-20℃で凍結して保存した。

## 【0341】

対照としてPCRを行った。すなわち、各50 pmolのプライマーVd3、Vd4と上記cDNA溶液1  $\mu$  lあるいは水により10倍、100倍、1000倍、10000倍希釈したもの1  $\mu$  lまたは陰性対照として水1  $\mu$  lと10× Ex Taqバッファー 5  $\mu$  l、1.25 Uのタカラ Exタック ポリメラーゼ、0.2 mM dNTP混合液を含む全液量50  $\mu$  lの反応系でサーマルサイクラーを用い、94℃ 2分間を1サイクル、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとする35サイクル、72℃ 5分間を1サイクルのプログラムで反応を行った。反応後のサンプルは分析するまで-20℃で凍結して保存した。

## 【0342】

上記ICAN反応液およびPCR反応液5  $\mu$  lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図24に示す。すなわち、図24はPfu RNase Hを使用したICAN法及びPCR法でのウィロイドの検出結果を示すもので

あり、レーン1は100bp DNAラダーマーカー、レーン2は陰性対照、レーン3はcDNAの10000倍希釈サンプル、レーン4はcDNAの1000倍希釈サンプル、レーン5はcDNAの100倍希釈サンプル、レーン6はcDNAの10倍希釈サンプル、レーン7はcDNAの原液サンプルの場合である。

【0343】

図24に示したようにICANおよびPCRのいずれの反応においても、100倍希釈したcDNAまで目的の増幅産物を確認することができた。

【0344】

実施例28

K-ras遺伝子の検出について検討した。

(1) ゲノムDNAからの検出

ヒトc-Ki-rasの塩基配列に従って、配列表の配列番号126及び127記載のc-Ki-ras-1及びc-Ki-ras-2プライマーを構築した。

前記各60pmolのプライマー、2μlの0.25%プロピレンジアミン水溶液、ヒトゲノムDNA（クロンテック社製）100ng～1ngの鋳型を含む全液量10μlの混合液を調製した。該混合液をサーマルサイクラーパーソナルで98℃で2分間処理後、53℃の加熱処理により鋳型にプライマーをアニーリングさせた。

【0345】

上記アニーリング処理をした各溶液に0.625mM dNTP混合液、40mM ヘプスー水酸化カリウム緩衝溶液（pH7.8）、125mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、30Uの大腸菌由来RNaseH及び5.5UのBcaBest DNAポリメラーゼを含む全液量40μlの反応液を添加し、最終容量を50μlにした。該反応液を53℃で1時間保持した。反応終了後、該反応液5μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。

【0346】

一方、対照としてPCRを行った。プライマーは、配列表の配列番号128及

び129記載のc-Ki-ras-3、c-Ki-ras-4プライマーを使用した。上記プライマー60pmol、上記鋳型100ng~0.1ng、10×Exタックバッファ5μl、1.25Uのタカラ Exタック ポリメラーゼ、0.2mM dNTPを含む全量50μlの溶液を調製し、サーマルサイクラーパーソナルを用い、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとする30または35サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図25に示す。すなわち、図25はICAN法及びPCR法でのヒトゲノムDNAからのc-Ki-ras遺伝子の検出結果を示すものであり、ICAN法では、レーン1は分子量マーカー、レーン2は鋳型100ng、レーン3は鋳型10ng、レーン4は鋳型1ng、レーン5は鋳型なしの場合である。PCR法では、レーン1は鋳型100ng、レーン2は鋳型10ng、レーン3は鋳型1ng、レーン4は鋳型なしの場合である。

## 【0347】

図25に示したようにICAN法では、鋳型1ngまで、PCR法では、30サイクルで鋳型10ngまで、目的の増幅産物が確認できた。さらに、鋳型が1ngから100ngの場合のICAN法とPCR法での増幅産物量の比較結果を図30に示す。図30に示したように、ICAN法がPCR法に比較して、増幅産物量が多いことが確認できた。

## 【0348】

## (2) 血液サンプルからの検出

抗凝固剤として、クエン酸ナトリウムおよびヘパリンを用いて健常人から採血した血液サンプルそれぞれ100μlよりGenとるくん<sup>TM</sup>（血液用）（宝酒造社製）を用いてゲノムDNAを調製してきた。調製した血液換算で5μl~0.04μlのDNAよりICAN反応により上記(1)と同様の条件でc-Ki-ras遺伝子の検出を行った。さらに、ICAN反応とPCR反応によるDNAの検出感度を比較するために、上記(1)と同様の条件で上記血液サンプル由来DNA 5μl~0.04μlからの検出を行った。その結果を図26に示す。すなわち、図26は、ICAN法及びPCR法での血液サンプルからのc-Ki

—ras 遺伝子の検出結果であり、ICAN法では、レーン1は分子量マーカー、レーン2はクエン酸血  $5\mu\text{l}$ 、レーン3はクエン酸血  $1\mu\text{l}$ 、レーン4はクエン酸血  $0.2\mu\text{l}$ 、レーン5はクエン酸血  $0.04\mu\text{l}$ 、レーン6はヘパリン血  $5\mu\text{l}$ 、レーン7はヘパリン血  $1\mu\text{l}$ 、レーン8はヘパリン血  $0.2\mu\text{l}$ 、レーン9はヘパリン血  $0.04\mu\text{l}$  の場合である。また、PCR法では、レーン1は分子量マーカー、レーン2はクエン酸血  $5\mu\text{l}$  で30サイクル、レーン3はクエン酸血  $1\mu\text{l}$  で30サイクル、レーン4はクエン酸血  $0.2\mu\text{l}$  で30サイクル、レーン5はクエン酸血  $0.04\mu\text{l}$  で30サイクル、レーン6はクエン酸血  $5\mu\text{l}$  で35サイクル、レーン7はクエン酸血  $1\mu\text{l}$  で35サイクル、レーン8はクエン酸血  $0.2\mu\text{l}$  で35サイクル、レーン9はクエン酸血  $0.04\mu\text{l}$  で35サイクル、レーン10はヘパリン血  $5\mu\text{l}$  で30サイクル、レーン11はヘパリン血  $1\mu\text{l}$  で30サイクル、レーン12はヘパリン  $0.2\mu\text{l}$  で30サイクル、レーン13はヘパリン  $0.04\mu\text{l}$  で30サイクル、レーン14はヘパリン血  $5\mu\text{l}$  で35サイクル、レーン15はヘパリン血  $1\mu\text{l}$  で35サイクル、レーン16はヘパリン  $0.2\mu\text{l}$  で35サイクル、レーン17はヘパリン  $0.04\mu\text{l}$  で35サイクルの場合である。

#### 【0349】

図26に示したように、ICAN法では、いずれの血液サンプルからも血液換算で  $0.2\mu\text{l}$  相当のゲノムDNAまで、PCR法では、クエン酸血については、30サイクルで  $0.2\mu\text{l}$ 、ヘパリン血についても30サイクルで  $0.2\mu\text{l}$  相当まで目的の増幅産物が確認できた。

#### 【0350】

#### 実施例29

Bca RNase HIIIを用いた大腸菌O-157ベロ毒素2型(VT-2) 遺伝子の検出について検討した。腸管出血性大腸菌であるO-157をノボピオシン加mEC培地において  $42^{\circ}\text{C}$ 、18時間培養後、 $95^{\circ}\text{C}$ 、10分間熱処理を行った。これを滅菌水にて0、1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 相当細胞数液に調製し、鋳型として使用した。検出用プライマーとして、配列表の配列番号130～131記載の塩基配列で示されるVT-2 IF4プライマー及びVT-2 I

R3プライマ)を合成した。該プライマー対で得られる増幅産物は約146bpである。反応は以下のようにして行った。すなわち、各50pmolの上記プライマー、最終濃度0.01%プロピレンジアミン、上記各細胞数熱抽出液を添加し、10 $\mu$ lに調製した。この混合液をサーマルサイクラーパーソナルにて98 $^{\circ}$ C 2分間熱処理、55 $^{\circ}$ C 1分間保温後、氷上に置いた。該混合液に、最終濃度34mM トリシンバッファー(pH8.7)、10mM 塩化カリウム、10mM 硫酸アンモニウム、1%ジメチルスルホキシド、0.01%ウシ血清アルブミン、4mM 酢酸マグネシウム、各500 $\mu$ M dNTPs、参考例3(5)にて調製したBca RNaseHIII 32U、5.5UのBca BEST DNAポリメラーゼを添加し最終容量を50 $\mu$ lにした。この反応液を、あらかじめ55 $^{\circ}$ Cに設定したサーマルサイクラーにセットし、60分間反応させた。反応終了後、各反応液3 $\mu$ lを4%ヌシープ3:1アガロース電気泳動に供した。その結果を図27に示す。すなわち、図27は、Bca RNaseHIIIを用いた大腸菌O-157ペロ毒素II型(VT2)遺伝子の検出結果を示すものであり、レーンMは分子量マーカー(100bpラダー)、レーンNは滅菌水を鋳型とした場合、レーン1は1セル相当、レーン2は10セル相当、レーン3は10<sup>2</sup>セル相当、レーン4は10<sup>3</sup>相当の鋳型の場合である。

## 【0351】

図27に示すように、ICAN法で1セル相当の熱抽出物からもVT2遺伝子を検出することができた。この結果は、実施例9で示される大腸菌RNaseHを使用した場合のICAN法およびPCRによる検出反応と同等の結果であり、耐熱性のRNaseHであるBca RNaseHIIIを使用したICAN法もまた、ウイルス、細菌等の検出方法として有効であることが確認できた。

## 【0352】

## 実施例30

黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子の検出について検討した。まず、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子領域の塩基配列に従って、配列表の配列番号136及び137のプライマーSEA-1、SEA-2をそれぞれ合成した。次に115pg、1.15ngのATCC登録番号13565の黄色ブドウ球

菌由来ゲノムDNA  $1\mu\text{l}$ あるいは陰性対照の水  $1\mu\text{l}$ と、これに前記各  $50\text{pmol}$ の上記プライマー、 $0.5\text{mM}$  dNTP混合液、 $32\text{mM}$  ヘプスー水酸化カリウム緩衝液 ( $\text{pH}7.8$ )、 $100\text{mM}$  酢酸カリウム、 $4.0\text{mM}$  酢酸マグネシウム、 $0.01\%$ ウシ血清アルブミン、 $1.0\%$ ジメチルスルホキシド、 $0.0156\mu\text{g}$ のPfu RNase H、 $1\text{U}$ のBcaBEST DNAポリメラーゼを含む全液量  $50\mu\text{l}$ の反応液をサーマルサイクラーで $58^\circ\text{C}$ 、 $1$ 時間保温した。反応終了後、該反応液  $5\mu\text{l}$ を $3.0\%$ アガロースゲル電気泳動により分析した。その結果を図29に示す。図29は、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA遺伝子検出の電気泳動結果であり、レーン1は分子量マーカー ( $100\text{bp}$ ラダー)、レーン2は陰性対照 (滅菌水)、レーン3は鋳型  $115\text{pg}$ 、レーン4は鋳型  $1.15\text{ng}$ の場合である。

## 【0353】

図29に示したように、鋳型が約  $1.15\text{ng}$ の場合まで目的の増幅産物の増加が確認できた。

## 【0354】

## 実施例31

C型肝炎ウイルス (HCV: Hepatitis C Virus) の検出について検討した。まずHCVの塩基配列に従って、配列表の配列番号138及び139記載の塩基配列を有するプライマーHCV-F3、HCV-R1をそれぞれ合成した。次に鋳型DNAは以下のように調製した。すなわち、健常人およびHCV患者の血清  $100\mu\text{l}$ より実施例21と同様の方法で調製したRNA、 $10\text{mM}$  トリスー塩酸緩衝液 ( $\text{pH}8.3$ )、 $5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $1\text{mM}$  dNTP、 $10\text{pmol}$ のランダム6mers、 $10\text{U}$ のReverse Transcriptase XL (宝酒造社製)を含む全量  $4\mu\text{l}$ をサーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9600、アプライドバイオシステムズ社製)を用いて $30^\circ\text{C}$ で $10$ 分間、続いて $42^\circ\text{C}$ で $1$ 時間保温した後、酵素を失活させるために $99^\circ\text{C}$ で $5$ 分間加熱してcDNAを調製した。

## 【0355】

上記cDNA反応溶液  $1\mu\text{l}$ と上記各  $100\text{pmol}$ のHCV-F3及びHC

V-R1プライマーを用いる以外は、実施例13と同様の条件下でICAN反応を55℃、1時間行った。反応終了後、該反応液2.5 $\mu$ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図31に示す。図31は、C型肝炎ウイルス検出の電気泳動結果であり、レーン1は分子量マーカー(100bp)、レーン2は健常人、レーン3～レーン6はHCV感染患者のそれぞれの血清より調製した鋳型を用いた場合である。

## 【0356】

図31に示したようにHCV感染患者の血清サンプルから特異的にHCVを検出できることが確認できた。

## 【0357】

## 実施例32

本発明の増幅方法について検討した。

(1) 実施例2(2)で調製したpUC19-150プラスミドDNAを鋳型にし、配列表の配列番号35及び36記載のMCS-F、MCS-Rプライマーを用いてPCRを行った後、マイクロコン-100(ミリポア社製)で精製し、534bpのPCR増幅断片を得た。上記PCR断片15ngに30pmolの5'末端を[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPでリン酸化ラベルした配列表の配列番号140記載の塩基配列を有するMR1プライマー及び滅菌蒸留水で5 $\mu$ lとした反応液、さらに配列表の配列番号141記載の塩基配列を有するMF2プライマー30pmolを加えた反応液を用意した。これらの反応液を98℃2分間熱変性後、55℃まで冷却した後、1UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む反応液(42.5mM トリシン緩衝液(pH8.7)、12.5mM 塩化カリウム、12.5mM 硫酸アンモニウム、0.0125%BSA、1.25%DMSO、5mM 酢酸マグネシウム、各0.625mMdNTP)20 $\mu$ lを添加し55℃で15分間反応した。反応終了後、5 $\mu$ lの反応液に2.5 $\mu$ lの反応停止液(95%ホルムアミド、20mM EDTA、0.05%プロモフェノール、0.5%キシレンシアノール)を加えて、94℃3分間の熱変性を行った。この反応液1.6 $\mu$ lを8M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、BAS2000(フジックス)でシグナルを読みとり、MR1プ

ライマーからの伸長産物を検出した。

その結果を図32Aに示す。図32A中のシーケンスラダーは $[\gamma-^{32}\text{P}]$  ATPでリン酸化ラベルしたMF2プライマーを用いてM13mp18 single strand DNA (宝酒造社製)を配列決定したものであり伸長産物の長さを決定するのに使用した。さらに、レーン1はMF2及びMR1プライマーの組み合わせ、レーン2はMR1を用いた場合である。

#### 【0358】

図32Aに示したように上記鑄型にMR1プライマーのみを加えて伸長反応した場合はMR1プライマーより鑄型の末端まで伸長した448bpのバンドが検出されたが、さらにMF2プライマーを加えることにより、上記のバンドに加えて、MR1プライマーとMF2プライマーに挟まれた373bpのバンドが検出された。従って、最初、BcaBEST DNAポリメラーゼにより、PCR増幅断片を鑄型にしてMR1プライマーより伸長していたものが、途中、鑄型交換により、MF2プライマーからの伸長鎖を鑄型として伸長したことが確認できた。さらに、鎖置換活性を有する常温菌由来のDNAポリメラーゼとしてクレノウ

DNAポリメラーゼを用いた場合について、上記と同様の条件で検討を行ったところ、鑄型交換が起こっていることが確認できた。一方、鎖置換活性を有さないタカラ Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) やPyroBEST DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いた場合には鑄型交換は確認できなかった。

#### 【0359】

(2) 上記鑄型交換反応に、プライマーがアニーリングしている鑄型DNA鎖について検討した。最初にMF2プライマー及びMR1プライマーがアニーリングできるDNA断片を以下のように調製した。pUC19プラスミドを鑄型にMCSFプライマーとRVプライマー (宝酒造社製) およびM4プライマー (宝酒造社製) とMCSRプライマーを用いてPCRを行い、マイクロコンー100で精製し、236bpと271bpのPCR増幅断片、MSCF-RV断片及びM4-MCSR断片を得た。この2つのPCR増幅断片の中でM4プライマーとRVプライマーには含まれた領域は共通配列である。



## 【0360】

次に、プライマーがアニーリングしている鋳型DNA鎖同士がアニーリングしていない形態の鋳型-プライマー（1）とプライマーがアニーリングしている鋳型DNA鎖同士がアニーリングしている形態の鋳型-プライマー（2）を以下のように作製した。

## 【0361】

（1）MCSF-RV断片、30 ngに40 pmolの5'末端を $[\gamma-^{32}\text{P}]$  ATPでリン酸化ラベルしたMF2プライマーとプロピレンジアミンを最終濃度0.01%になるよう添加し滅菌蒸留水で5  $\mu$  lとした反応液およびM4-MCSR断片、30 ngに40 pmolのMR1プライマーとプロピレンジアミンを最終濃度0.01%になるよう添加し、滅菌蒸留水で5  $\mu$  lとした反応液を別々に98℃2分間熱変性後、55℃まで冷却した後、それぞれの反応液2.5  $\mu$  lずつ混合して鋳型-プライマーを調製した。

## 【0362】

（2）MCSF-RV断片、15 ng、M4-MCSR断片、15 ng、20 pmolの5'末端を $[\gamma-^{32}\text{P}]$  ATPでリン酸化ラベルしたMF2プライマー、20 pmolのMR1プライマー、及びプロピレンジアミンを最終濃度0.01%になるよう添加し、滅菌蒸留水で5  $\mu$  lとした反応液を98℃2分間熱変性後、55℃まで冷却して鋳型-プライマーを調製した。

## 【0363】

上記、鋳型-プライマー反応液5  $\mu$  lに1 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを含む反応液（42.5 mMトリシン緩衝液（pH8.7）、12.5 mM塩化カリウム、12.5 mM硫酸アンモニウム、0.0125%BSA、1.25%DMSO、5 mM酢酸マグネシウム、各0.625 mM dNTP）20  $\mu$  lを添加し55℃で15分間反応した。反応終了後、5  $\mu$  lの反応液に2.5  $\mu$  lの反応停止液（95%ホルムアミド、20 mM EDTA、0.05%プロモフェノールブルー、0.5%キシレンシアノール）を加えて、94℃3分間の熱変性を行った。この反応液1.6  $\mu$  lを8 M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、BAS2000（フジックス）でシグナル

を読みとりMF2プライマーからの伸長産物を検出した。その結果を図32Bに示す。図32B中のシーケンスラダーは $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATPでリン酸化ラベルしたMR1プライマーを用いてM13mp18 single strand DNAを配列決定したものであり、伸長産物の長さを決定するのに使用した。さらに、レーン1は鋳型DNA鎖がアニーリングしていない場合、レーン2は鋳型DNA鎖がアニーリングしている場合である。

## 【0364】

図32Bに示したようにプライマーがアニーリングしている鋳型DNA鎖同士がアニーリングしていない形態の鋳型-プライマーの場合にはMF2プライマーより鋳型の末端まで伸長した161bpのバンドのみが検出されたが、プライマーがアニーリングしている鋳型DNA鎖同士がアニーリングしている形態の鋳型-プライマーの場合には、上記のバンドに加えて、MF2プライマーとMR1プライマーに挟まれた223bpのバンドが検出された。従って、プライマーがアニーリングしている鋳型DNA鎖同士がアニーリングしている場合は、鋳型交換反応が起こることが確認できた。

## 【発明の効果】

本発明により、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するDNA合成反応により標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域を増幅することを特徴とする標的核酸の増幅方法が提供される。また、該標的核酸の増幅方法で得られた標的核酸の増幅断片を検出する工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法が提供される。また、本発明の増幅方法は、他の核酸増幅方法あるいは核酸複製方法と組み合わせて使用することにより、効率的な核酸配列の製造方法として利用できる。また、本発明によりウイルス、細菌、カビ、酵母などの微生物、特に病原性微生物等の高感度、特異的検出、定量のための標的核酸の検出方法及び該方法のためのキメラオリゴヌクレオチドプライマーが提供される。さらに、本発明により自動化、微量化、高集積化された核酸の増幅、検出システムが提供される。

## 【0365】

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 3】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 4】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 5】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 6】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 7】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 8】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 9】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 10】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 11】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 12】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 13】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 14】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 15】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電

気泳動写真である。

【図 1 6】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 1 7】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 1 8】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 1 9】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2 0】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2 1】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2 2】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2 3】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2 4】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2 5】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2 6】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2 7】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 2 8】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真及びドットハイブリ結果である。

【図 2 9】 本発明の方法により増幅された増幅 DNA 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 3 0】 本発明の方法及び P C R 法により増幅された増幅産物量の比較グラフである。

【図 3 1】 本発明の方法により増幅された増幅 D N A 断片のアガロース電気泳動写真である。

【図 3 2】 本発明の方法により増幅された増幅 D N A 断片のポリアクリルアミド電気泳動写真である。

【図 3 3】 本発明の核酸の増幅方法の一態様を示した図である。

【図 3 4】 本発明の核酸の増幅方法の一態様を示した図である。

【図 3 5】 本発明の核酸の増幅方法の一態様を示した図である。

【図 3 6】 本発明の核酸の増幅方法の一態様を示した図である。

【 0 3 6 6 】

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:1: PCR primer BsuII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax.

SEQ ID NO:2: PCR primer BsuII-6 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax.

SEQ ID NO:3: PCR primer RNII-S1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax.

SEQ ID NO:4: PCR primer RNII-S2 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax.

SEQ ID NO:5: PCR primer RNII-S5 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax.

SEQ ID NO:6: PCR primer RNII-S6 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax.

SEQ ID NO:7: PCR primer RNII-Nde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax.

SEQ ID NO:8: Nucleotide sequence of ORF in RNaseHII gene from Bacillus caldotenax.

SEQ ID NO:9: Amino acid sequence of RNaseHII from Bacillus caldotenax.

SEQ ID NO:10: PCR primer BsuIII-1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:11: PCR primer BsuIII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:12: PCR primer BsuIII-6 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:13: PCR primer BsuIII-8 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:14: PCR primer RNIII-S3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:15: PCR primer BcaRNIII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:16: Nucleotide sequence of ORF in RNaseHIII from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:17: Amino acid sequence of RNaseHIII from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:18: PCR primer BcaRNIIINde for amplifying a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*.

SEQ ID NO:19: Nucleotide sequence conserving between PH1650 and a portion of *Pyrococcus furiosus* genome sequence.

SEQ ID NO:20: PCR primer 1650Nde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Pyrococcus furiosus*.

SEQ ID NO:21: PCR primer 1650Bam for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Pyrococcus furiosus*.

SEQ ID NO:22: Nucleotide sequence of ORF in RNaseHII from *Pyrococcus furiosus*.

SEQ ID NO:23: Amino acid sequence of RNaseHII from *Pyrococcus furiosus*.

SEQ ID NO:24: PCR primer 915-F1 for cloning a gene encoding a polypeptide

ide having a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*.

SEQ ID NO:25: PCR primer 915-F2 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*.

SEQ ID NO:26: PCR primer 915-R1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*.

SEQ ID NO:27: PCR primer 915-R2 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*.

SEQ ID NO:28: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:29: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 28 to 30 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:30: Designed oligonucleotide primer designated as M13M4

SEQ ID NO:31: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:32: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "nucleotides 15 to 17 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:33: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:34: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are

deoxyribonucleotides”

SEQ ID NO:35: Designed oligonucleotide primer designated as MCR-F to amplify a long DNA fragment

SEQ ID NO:36: Designed oligonucleotide primer designated as MCR-R to amplify a long DNA fragment

SEQ ID NO:37: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a long DNA fragment. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID NO:38: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a long DNA fragment. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID NO:39: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID NO:40: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID NO:41: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA

SEQ ID NO:42: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA

SEQ ID NO:43: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID NO:44: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID NO:45: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA.



SEQ ID NO:46: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of *Flavobacterium* species DNA.

SEQ ID NO:47: esigned chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:48: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:49: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157.

SEQ ID NO:50: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157.

SEQ ID NO:51: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:52: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:53: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:54: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic *Escherichia coli* 0-157.

SEQ ID NO:55: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

SEQ ID NO:56: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:57: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd.

SEQ ID NO:58: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd.

SEQ ID NO:59: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:60: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:61: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:62: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:63: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:64: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides—nucleotide 18 is inosine—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:65: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a po

rtion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 17 is inosine other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:66: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 16 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:67: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 17 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:68: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 16 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:69: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 15 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:70: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 9 to 11 and 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:71: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 8 to 10 and 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:72: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli

i 0-157. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:73: Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

SEQ ID NO:74: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:75: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse. "nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:76: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse.

SEQ ID NO:77: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse

SEQ ID NO:78: Designed oligonucleotide primer designated as GMO-PCR-F 20mer

SEQ ID NO:79: Designed oligonucleotide primer designated as GMO-PCR-R 20mer

SEQ ID NO:80: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as GMO-S1 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:81: Designed oligonucleotide primer designated as GMO-S2 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:82: Designed oligonucleotide primer designated as GMO-A1 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:83: Designed oligonucleotide primer designated as GMO-A2 20

mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:84: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 18 to 20 are (alpha-thio)ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:85: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 18 to 20 are (alpha-thio)ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:86: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse."nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:87: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse."nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:88: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse.

SEQ ID NO:89: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse.

SEQ ID NO:90: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:91: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:92: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse."nucleotides 21 to 23 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:93: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse."nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:94: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of pDON-AI DNA."nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:95: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of pDON-AI DNA."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:96: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of HPV DNA."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:97: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of HPV DNA."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:98: Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying a portion of HPV DNA.

SEQ ID NO:99: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of HCV.

SEQ ID NO:100: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of HCV.

SEQ ID NO:101: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of HCV."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:102: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of HCV."nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:103: Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying portion of HCV.

SEQ ID NO:104: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of adenovirus."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:105: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of adenovirus."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:106: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of adenovirus."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:107: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of adenovirus

SEQ ID NO:108: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of adenovirus.

SEQ ID NO:109: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd.

SEQ ID NO:110: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd.

SEQ ID NO:111: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of pDON-AI DNA.

SEQ ID NO:112: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of pDON-AI DNA.

SEQ ID NO:113: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin-1 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:114: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin-1 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:115: Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying a portion of verotoxin-1 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

SEQ ID NO:116: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of botulinum toxin A encoding sequence from Clostridium botulinum. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:117: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of botulinum toxin A encoding sequence from Clostridium botulinum. "nucleotides 21 to 23 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:118: Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying a portion of botulinum toxin A encoding sequence from Clostridium botulinum.

SEQ ID NO:119: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:120: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:121: Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying a portion of viroid CSVd.

SEQ ID NO:122: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:123: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:124: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of



viroid CSVd.

SEQ ID NO:125: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd.

SEQ ID NO:126: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of c-ki-ras oncogene."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:127: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of c-ki-ras oncogene."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:128: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of c-ki-ras oncogene.

SEQ ID NO:129: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of c-ki-ras oncogene.

SEQ ID NO:130: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin-1 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:131: Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin-1 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:132: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse.

SEQ ID NO:133: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse.

SEQ ID NO:134: Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:135: Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:136: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as SEA-1 to amplify a portion of Staphylococcus aureus. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:137: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as SEA-2 to amplify a portion of Staphylococcus aureus. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:138: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as HCV-F3 to amplify a portion of HCV. "nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:139: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as HCV-R1 to amplify a portion of HCV. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:140: Designed oligonucleotide primer designated as MF2 to amplify a portion of pUC19 plasmid DNA.

SEQ ID NO:141: Designed oligonucleotide primer designated as MR1 to amplify a portion of pUC19 plasmid DNA.

SEQ ID NO:142: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of adenovirus.

【 0 3 6 7 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A method for amplification of nucleic acids

<130> T-1554

<160> 142

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

<400> 1

gtcgccagcg cagtnathyt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuII-6 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

<400> 2

cggtcctcg tcacyttingc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RNII-S1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

<400> 3

cgcgcttttc cggcgtcagc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RNII-S2 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

<400> 4

acggcgcacg cttcaatttg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RNII-S5 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus cald tenax

<400> 5

acgcctattt gccggggctt 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RNII-S6 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

<400> 6

atgaccgacg cagcggcgat 20

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RNII-Nde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Bacillus caldotenax

<400> 7

tagaagaggg agaggcatat gaagcggtat acggtgaaa 39

<210> 8

<211> 780

<212> DNA

<213> *Bucillus caldotenax*

<400> 8

```

atgaagcggg atacggtgaa agacattgaa ggcgtgcttc cgaagcttgg cgcggacgac   60
ccgcgctggg agatgctgcg gcaggatgag cgaaaaagcg tgcaggcgct tcttgcccgt  120
tttgaaaggc agaaagcgcg ccggcacgcc atcgagcagc ggtgggaaga actaatgcgt  180
tatgagaggg aactatacgc cgctggcggtt agacggatcg ccggcattga tgaggccggg  240
cgcggccccg tggccggccc ggtcgtcgcc gccgcggtca tcttgccgaa agacgcctat  300
ttgccggggc ttgacgactc gaagcggctg acgccggaaa agcgcgaggc attgtttgcg  360
caaattgaag cgtgcgccgt cgccatcggc atcggcacg tcagcgcggc ggagatcgat  420
gaaaggaata ttacgaagc gacaaggcaa gcgatggcga aagcggtgaa cgccctttcc  480
ccgccgcctg aacatttgct tgttgatgcg atggcgggtg cgtgcccact gccgcaacag  540
cgcctcataa aaggagacgc caacagcgct tcaatcgccg ctgcgtcggc catcgccaaa  600
gtgacgcgcg accggtggat gaaagaactg gatcgccgct atccacaata cgggttcgcg  660
cgccatatgg gctacggaac gccggaacat ttcgaggcga tccgccgcta cggcgttacg  720
cctgagcacc gtcgttcggt cgcaccggtg agggagggtg tgaaggcgag cgagcagctc  780

```

<210> 9

<211> 260

<212> PRT

<213> *Bucillus caldotenax*

<400> 9

```

Met Lys Arg Tyr Thr Val Lys Asp Ile Glu Ala Leu Leu Pro Lys
  1           5           10           15
Leu Gly Ala Asp Asp Pro Arg Trp Glu Met Leu Arg Gln Asp Glu
           20           25           30
Arg Lys Ser Val Gln Ala Leu Leu Ala Arg Phe Glu Arg Gln Lys

```

35	40	45
Ala Arg Arg His Ala Ile Glu Gln Arg Trp Glu Glu Leu Met Arg		
50	55	60
Tyr Glu Arg Glu Leu Tyr Ala Ala Gly Val Arg Arg Ile Ala Gly		
65	70	75
Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Leu Ala Gly Pro Val Val Ala		
80	85	90
Ala Ala Val Ile Leu Pro Lys Asp Ala Tyr Leu Pro Gly Leu Asp		
95	100	105
Asp Ser Lys Arg Leu Thr Pro Glu Lys Arg Glu Ala Leu Phe Ala		
110	115	120
Gln Ile Glu Ala Cys Ala Val Ala Ile Gly Ile Gly Ile Val Ser		
125	130	135
Ala Ala Glu Ile Asp Glu Arg Asn Ile Tyr Glu Ala Thr Arg Gln		
140	145	150
Ala Met Ala Lys Ala Val Asn Ala Leu Ser Pro Pro Pro Glu His		
155	160	165
Leu Leu Val Asp Ala Met Ala Val Pro Cys Pro Leu Pro Gln Gln		
170	175	180
Arg Leu Ile Lys Gly Asp Ala Asn Ser Ala Ser Ile Ala Ala Ala		
185	190	195
Ser Val Ile Ala Lys Val Thr Arg Asp Arg Trp Met Lys Glu Leu		
200	205	210
Asp Arg Arg Tyr Pro Gln Tyr Gly Phe Ala Arg His Met Gly Tyr		
215	220	225
Gly Thr Pro Glu His Phe Glu Ala Ile Arg Arg Tyr Gly Val Thr		
230	235	240
Pro Glu His Arg Arg Ser Phe Ala Pro Val Arg Glu Val Leu Lys		
245	250	255

Ala Ser Glu Gln Leu

260

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuIII-1 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

<400> 10

ggtaaggtct tggttcargg 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuIII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

<400> 11

ggaaccggag attayttygg 20

<210> 12

<211> 20



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuIII-6 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

<400> 12

atgattgaag cagcngcnac 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BsuIII-8 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from Bacillus caldotenax

<400> 13

gtattggcga aatgnarytt 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer RNIII-S3 for cloning a gene encoding a polypeptide having

ng a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*

<400> 14

cccgatcgtc gtcgccgccg 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BcaRNIII-3 for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*

<400> 15

gatacgtgga cactttccgc 20

<210> 16

<211> 915

<212> DNA

<213> *Bacillus caldotenax*

<400> 16

gtgattcaag ccgaccaaca gctgcttgac gccttgccgc ccactacca agacgcctta 60  
tccgaccggc ttccggctgg agcgttggtt gccgtcaagc gcccggatgt cgtcatcacc 120  
gcctaccgct caggcaaagt gctgtttcaa gggaaagcgg cggagcaaga agcagcgaaa 180  
tggatatcag gggcgagcgc ctcaaacgaa acagctgacc accagccgtc cgctttggca 240  
gctcatcaac tcgggtctct ttccgccatc gggtccgatg aagtcggcac cggcgattat 300  
ttcggcccga tcgtcgtcgc cgccgcctac gtggatcggc cgcatatcgc caaaatcgcg 360

gcgcttggcg tgaagattc gaaacaattg aacgatgagg caatcaaacg gatcgcccc 420  
gccatcatgg aaaccgtgcc gcatgcggtc accgtgttgg acaatgccga atacaaccgc 480  
tggcagcgaa gcggcatgcc gcagacgaaa atgaaagcgc tccttcacaa ccggacgctc 540  
gtgaaactcg ttgacgccat cgcgcccgcc gaaccagaag caatcatcat cgacgaattt 600  
ttaaaacggg attcgtattt ccgttacctt tccgatgaag atcgattat ccgcgagcgg 660  
gtgcactgcc ttccaaggc ggaaagtgtc cacgtatcag tcgccgccgc ctgatcatc 720  
gcccgcctatg tgtttttaga ggagatggag caattatccc gcgccgtcgg cctcctgctt 780  
ccaaaaggcg ccggcgccat tgtcgatgaa gccgcggcca acatcatccg cgcgcggggg 840  
gcggaagcgc ttgagacatg cgccaagctt catttcgcca atacaaaaaa ggcgctggac 900  
atcgccaaac gccgg 915

<210> 17

<211> 305

<212> PRT

<213> *Bucillus caldotenax*

<400> 17

Met Ile Gln Ala Asp Gln Gln Leu Leu Asp Ala Leu Arg Ala His

1 5 10 15

Tyr Gln Asp Ala Leu Ser Asp Arg Leu Pro Ala Gly Ala Leu Phe

20 25 30

Ala Val Lys Arg Pro Asp Val Val Ile Thr Ala Tyr Arg Ser Gly

35 40 45

Lys Val Leu Phe Gln Gly Lys Ala Ala Glu Gln Glu Ala Ala Lys

50 55 60

Trp Ile Ser Gly Ala Ser Ala Ser Asn Glu Thr Ala Asp His Gln

65 70 75

Pro Ser Ala Leu Ala Ala His Gln Leu Gly Ser Leu Ser Ala Ile

80 85 90

Gly Ser Asp Glu Val Gly Thr Gly Asp Tyr Phe Gly Pro Ile Val		
	95	100 105
Val Ala Ala Ala Tyr Val Asp Arg Pro His Ile Ala Lys Ile Ala		
	110	115 120
Ala Leu Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu Asn Asp Glu Ala Ile		
	125	130 135
Lys Arg Ile Ala Pro Ala Ile Met Glu Thr Val Pro His Ala Val		
	140	145 150
Thr Val Leu Asp Asn Ala Glu Tyr Asn Arg Trp Gln Arg Ser Gly		
	155	160 165
Met Pro Gln Thr Lys Met Lys Ala Leu Leu His Asn Arg Thr Leu		
	170	175 180
Val Lys Leu Val Asp Ala Ile Ala Pro Ala Glu Pro Glu Ala Ile		
	185	190 195
Ile Ile Asp Glu Phe Leu Lys Arg Asp Ser Tyr Phe Arg Tyr Leu		
	200	205 210
Ser Asp Glu Asp Arg Ile Ile Arg Glu Arg Val His Cys Leu Pro		
	215	220 225
Lys Ala Glu Ser Val His Val Ser Val Ala Ala Ala Ser Ile Ile		
	230	235 240
Ala Arg Tyr Val Phe Leu Glu Glu Met Glu Gln Leu Ser Arg Ala		
	245	250 255
Val Gly Leu Leu Leu Pro Lys Gly Ala Gly Ala Ile Val Asp Glu		
	260	265 270
Ala Ala Ala Asn Ile Ile Arg Ala Arg Gly Ala Glu Ala Leu Glu		
	275	280 285
Thr Cys Ala Lys Leu His Phe Ala Asn Thr Lys Lys Ala Leu Asp		
	290	295 300
Ile Ala Lys Arg Arg		

305

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BcaRNIINde for amplifying a gene encoding a polypeptide having a RNaseHIII activity from *Bacillus caldotenax*

<400> 18

cgaacgttgt caaacatat gattcaagcc gaccaacag 39

<210> 19

<211> 663

<212> DNA

<213> *Pyrococcus horikoshii*

<400> 19

atgaagggtg ctggagttga tgaagcgggg agggggccgg taattggccc gttagtaatt 60  
 ggagtagccg ttatagatga gaaaaatatt gagaggttac gtgacattgg ggttaaagac 120  
 tccaaacaat taactcctgg gcaacgtgaa aaactattta gcaaattaat agatataccta 180  
 gacgattatt atgttcttct cgttaccccc aaggaaatag atgagaggca tcattctatg 240  
 aatgaactag aagctgagaa attcgttgta gccttgaatt ctttaaggat caagccgcag 300  
 aagatatatg tggactctgc cgatgtagat cctaagaggt ttgctagtct aataaaggct 360  
 gggttgaaat atgaagccac ggttatcgcc gagcataaag ccgatgcaaa gtatgagata 420  
 gtatcggcag catcaataat tgcaaaggtc actagggata gagagataga gaagctaaag 480  
 caaaagtatg gggaatttgg ttctggctat ccgagtgatc cgagaactaa ggagtggctt 540

gaagaatatt acaaacaata tggtagcttt cctccaatag ttaggagaac ttgggaaacc 600  
gctaggaaga tagaggaaag gttagaaaa aatcagctaa cgcttgataa attccttaag 660  
tga 663

<210> 20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 1650Nde for cloning a gene encoding a polypeptide havin  
g a RNaseHII activity from Pyrococcus furiosus

<400> 20

caggaggaga gacatatgaa aataggggga att 33

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 1650Bam for cloning a gene encoding a polypeptide havin  
g a RNaseHII activity from Pyrococcus furiosus

<400> 21

gaaggttgatg gatccacttt ctaaggtttc tta 33

<210> 22

<211> 672

<212> DNA

<213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 22

```

ATGAAAATAG GGGGAATTGA CGAAGCAGGA AGAGGACCAG CGATAGGGCC ATTAGTAGTA   60
GCTACTGTCTG TCGTTGATGA GAAAAACATT GAGAAGCTCA GAAACATTGG AGTAAAAGAC  120
TCCAAACAAC TAACACCCCA TGAAAGGAAG AATTTATTTT CCCAGATAAC CTCAATAGCG  180
GATGATTACA AAATAGTGAT AGTATCCCCA GAAGAAATCG ACAATAGATC AGGAACAATG  240
AACGAGTTAG AGGTAGAGAA GTTTGCTCTC GCCTTAAATT CGCTTCAGAT AAAACCAGCT  300
CTTATATACG CTGATGCAGC GGATGTAGAT GCCAATAGAT TTGCAAGCTT GATAGAGAGA  360
AGACTCAATT ATAAGGCGAA GATTATTGCC GAACACAAGG CCGATGCAAA GTATCCAGTA  420
GTTTCAGCAG CTTCAATACT TGCAAAGGTT GTTAGGGATG AGGAAATTGA AAAATTAAAA  480
AAGCAATATG GAGACTTTGG CTCTGGGTAT CCAAGTGATC CAAAAACCAA GAAATGGCTT  540
GAAGAGTACT ACAAAAAACA CAACTCTTTC CCTCCAATAG TCAGACGAAC CTGGGAAACT  600
GTAAGAAAAA TAGAGGAAAG CATTAAAGCC AAAAAATCCC AGCTAACGCT TGATAAATTC  660
TTTAAGAAAC CT   672
    
```

<210> 23

<211> 224

<212> PRT

<213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 23

```

Met Lys Ile Gly Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile
  1             5             10             15
Gly Pr  Leu Val Val Ala Thr Val Val Val Asp Glu Lys Asn Ile
                20             25             30
    
```

Glu Lys Leu Arg Asn Ile Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu Thr		
35	40	45
Pro His Glu Arg Lys Asn Leu Phe Ser Gln Ile Thr Ser Ile Ala		
50	55	60
Asp Asp Tyr Lys Ile Val Ile Val Ser Pro Glu Glu Ile Asp Asn		
65	70	75
Arg Ser Gly Thr Met Asn Glu Leu Glu Val Glu Lys Phe Ala Leu		
80	85	90
Ala Leu Asn Ser Leu Gln Ile Lys Pro Ala Leu Ile Tyr Ala Asp		
95	100	105
Ala Ala Asp Val Asp Ala Asn Arg Phe Ala Ser Leu Ile Glu Arg		
110	115	120
Arg Leu Asn Tyr Lys Ala Lys Ile Ile Ala Glu His Lys Ala Asp		
125	130	135
Ala Lys Tyr Pro Val Val Ser Ala Ala Ser Ile Leu Ala Lys Val		
140	145	150
Val Arg Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Lys Lys Gln Tyr Gly Asp		
155	160	165
Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Lys Thr Lys Lys Trp Leu		
170	175	180
Glu Glu Tyr Tyr Lys Lys His Asn Ser Phe Pro Pro Ile Val Arg		
185	190	195
Arg Thr Trp Glu Thr Val Arg Lys Ile Glu Glu Ser Ile Lys Ala		
200	205	210
Lys Lys Ser Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro		
215	220	

<210> 24

<211> 28



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 915-F1 for cloning a gene encoding a polypeptide having  
a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*

<400> 24

aaaaagcttg ggaatagatg agctttac 28

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 915-F2 for cloning a gene encoding a polypeptide having  
a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*

<400> 25

aaaccatggg aatagatgag ctttac 26

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 915-R1 for cloning a gene encoding a polypeptide having

a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*

<400> 26

aaatctagat cctcaacttt gtcgatgtg 29

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 915-R2 for cloning a gene encoding a polypeptide having  
a RNaseHII activity from *Thermotoga maritima*

<400> 27

aatctagatt aaaaaagagg gagattatgg 30

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 upper  
150 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 24 to 25 are ri  
bonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 28

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtaug

25

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19. "nucleotides 28 to 30 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 29

tttacacttt atgcttccgg ctcgtatguu

30

<210> 30

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13M4

<400> 30

gttttcccag tcacgac

17

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 21 to 23 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 31

tgtcattcgc tctgcaatag gua

23

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 21 to 23 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 32

caccagacaa tgtaaccgct guu

23

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 33

tactgggttt ttcttcgua

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 34

atagacatca agccctcgua

20

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MCR-F to amplify a long DNA fragment

<400> 35

ccattcaggc tgcgcaactg tt

22

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MCR-R to amplify a long DNA fragment

<400> 36

tggcacgaca ggtttcccga ct

22

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a long DNA fragment. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides -other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 37

gctgcaaggc gattaagttg ggua

24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a long DNA fragment. "nucleotides 22 to 24 are ribonucleotides -other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 38

ctttatgctt ccggctcgta tguu

24

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA . "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 39

cccttctctg tttttgtccg

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of 1  
ambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 40

aagcacctca ttaccctugc

20

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA

<400> 41

gggcggcgac ctgcggggtt ttcg

24

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA

<400> 42

gctgcttatg ctctataaag tagg

24

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-ot her nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 43

aggaatcttt atttaccaug

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-ot her nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 44

tggtgtttaa acttattgcg

20

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of  
Flavobacterium species DNA.

<400> 45

ccatcagcta taaacacaaa cagc

24

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of  
Flavobacterium species DNA.

<400> 46

tgttttgacc aaacatagta atgc

24

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 47

tcgttaaata gtatacggac a

21

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 48

tgctcaataa tcagacgaag

20

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 49

aaatggggta ctgtgcctgt tact

24

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 50

ctctgtatct gcctgaagcg taag

24

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. " nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo

nucleotides”

<400> 51

tacctgggtt tttcttcggu a

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. ”  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides”

<400> 52

atagactttt cgacccaaca

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. ”  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides”

<400> 53

atagacatca agccctcgua

20

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin  
2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 54

tcgttaaata gtatacggac a

21

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin  
2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 55

atagacatca agccctcgta

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 56

gaacaatgga agtcaacaaa

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSV d.

<400> 57

tacttggtggt tcctgtggtg

20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSV  
d.

<400> 58

atactaaggt tccaagggt

20

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
iroid CSVd. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides  
are deoxyribonucleotides"

<400> 59

ggaaacctgg aggaaguc

18

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
iroid CSVd. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides  
are deoxyribonucleotides"



<400> 60

gtgaaaaccc tgtttaggau

20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-otherwise nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 61

acctagatat aagctctaca

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-otherwise nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 62

aaatagatgt tttagcagag

20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of Flavobacterium species DNA. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 63

atagataaaa aaaactccac

20

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 18 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 64

tcgttaaata gtatacgiac a

21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 17 is inosine other  
nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 65

tcgttaaata gtatacigac a

21

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-nucleotide 16 is inosine-other  
nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 66

tcgttaaata gtataiggac a

21

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 17 is inosine-other  
nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 67

tgctcaataa tcagaciaag

20

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 16 is inosine-other  
nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 68

tgctcaataa tcagaigaag

20

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-nucleotide 15 is inosine-other  
nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 69

tgctcaataa tcagtcgaag

20

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 9 to 11 and 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 70

tacctggguu uttcttcggu a

21

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA-DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 8 to 10 and 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 71

atagacauca agccctcgua

20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribo  
nucleotides"

<400> 72

gtcccctgag atatatguuc

20

<210> 73

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 73

ccaacaaagt tatgtctctt cgtaaataag

30

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of i NOS-encoding sequence from mouse. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 74

atgccattga gttcatcaac

20

<210> 75

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of i NOS-encoding sequence from mouse. "nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

des-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

<400> 75

tcttggtggc aaagatgag

19

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse.

<400> 76

atgccattga gttcatcaac

20

<210> 77

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of iNOS-encoding sequence from mouse

<400> 77

tcttggtggc aaagatgag

19



<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as GMO-PCR-F 20mer

<400> 78

atcgttgaag atgcctctgc

20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> designed oligonucleotide primer designated as GMO-PCR-R 20mer

<400> 79

tccgtatgat cgcgcgatcat

20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as GMO-S1 20me

r. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxy ribonucleotides"

<400> 80

tttggagagg acacgctgac

20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as GMO-S2 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 81

ggacacgctg acaagctgac

20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as GMO-A1 20mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 82

ggctgtagcc actgatgcug

20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed oligonucleotide primer designated as GMO-A2 20 mer. "nucleotides 19 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 83

ttccggaaag gccagaggau

20

<210> 84

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "nucleotides 18 to 20 are (alpha-thio)ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 84

tactgggtt tttcttcggu a

20

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
ero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157. "  
nucleotides 18 to 20 are (alpha-thio)ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 85

atagacatca agccctcgua

20

<210> 86

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of I  
NOS-encoding sequence from mouse."nucleotides 20 to 22 are ribonucleotid  
es-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 86

tcatgccatt gaggttcatca ac

22

<210> 87

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of I NOS-encoding sequence from mouse."nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 87

tggtaggttc ctgttgtttc ua

22

<210> 88

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse.

<400> 88

tcatgccatt gagttcatca ac

22

<210> 89

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed lignonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse.

<400> 89

tggtaggttc ctgttgtttc ta

22

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 90

ctgcgaggcg gtggcaaggg

20

<210> 91

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of lambda DNA."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 91

ctgcctcgct ggccgtgccg c

21

<210> 92

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of I NOS-encoding sequence from mouse."nucleotides 21 to 23 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 92

ctcatgccat tgagttcatc aac

23

<210> 93

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of I NOS-encoding sequence from mouse."nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 93

gctggtaggc tcctgttgtu uc

22

<210> 94

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of p  
DON-AI DNA."nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 94

agctctgtat ctggcggac

19

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of p  
DON-AI DNA."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 95

gatcgggatt tttagactca g

21

<210> 96

<211> 21



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of H  
PV type16 DNA."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotide  
s are deoxyribonucleotides"

<400> 96

caaaagagaa ctgcaatguu u

21

<210> 97

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of H  
PV type16 DNA."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotide  
s are deoxyribonucleotides"

<400> 97

gttgcttgca gtacacacau u

21

<210> 98

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying  
a portion of HPV DNA.

<400> 98

gaggacccac aggagcgacc cagaaag

27

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of HCV.

<400> 99

cactccacca tgaatcactc

20

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of HCV.

<400> 100

ggtgcacggt ctacgagacc

20

<210> 101

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of H  
CV."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxy  
ribonucleotides"

<400> 101

ctgtgaggaa ctactgtcuu c

21

<210> 102

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of H  
CV."nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxy  
ribonucleotides"

<400> 102

gcagaccact atggcucu

18

<210> 103

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying portion of HCV.

<400> 103

gtatgagtgt cgtgcagcct ccaggacccc

30

<210> 104

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of a denovirus."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 104

tgagacatat tatctgccac g

21

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of a

denovirus."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 105

aaatggctag gagtggaag a

21

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of a denovirus."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 106

ttatcagcca gtacctctuc g

21

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of adenovirus

<400> 107

tgagacatat tatctgccac g

21

<210> 108

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of adenovirus

<400> 108

aaatggctag gagtggaag a

21

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSV  
d.

<400> 109

ggggaaacct ggaggaagtc

20

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSV  
d.

<400> 110

cgggtagtag ccaaaggaag

20

<210> 111

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of pDON-AI DN  
A.

<400> 111

agctctgtat ctggcggac

19

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of pDON-AI DN  
A.

<400> 112

gatcgggatt ttggactca g

21

<210> 113

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
erotoxin-1 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157."nu  
cleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonu  
cleotides"

<400> 113

ggggataatt tgtttgcagu

20

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
erotoxin-1 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157."nu  
cleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonu  
cleotides"

<400> 114



tcgttcaaca ataagccgua

20

<210> 115

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying a portion of verotoxin-1 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.

<400> 115

cgcccttcct ctggatctac ccctctgaca

30

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of botulinum toxin A encoding sequence from Clostridium botulinum."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 116

caccagaagc aaaacaaguu c

21

<210> 117

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of botulinum toxin A encoding sequence from Clostridium botulinum."nucleotides 21 to 23 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 117

ctattgatgt taacaacatt cuu

23

<210> 118

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying a portion of botulinum toxin A encoding sequence from Clostridium botulinum.

<400> 118

gggagttaca aaattatttg agagaattta

30

<210> 119

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 119

cacccttcct ttagtttccu u

21

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSVd."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 120

cgttgaagct tcagttguuu

20

<210> 121

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide probe to detect a DNA fragment amplifying  
a portion of viroid CSVd.

<400> 121

ccttcctctc ctggagaggt cttctgccct

30

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
iroid CSVd."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 122

cacccttcct ttagtttccu u

21

<210> 123

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
iroid CSVd."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides a  
re deoxyribonucleotides"

<400> 123

cgttgaagct tcagttgtuu c

21

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSV  
d.

<400> 124

cacccttcct ttagtttcct t

21

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of viroid CSV  
d.

<400> 125

cgttgaagct tcagttgttt c

21

<210> 126

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of c  
-ki-ras oncogene."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleot  
ides are deoxyribonucleotides"

<400> 126

gactgaatat aaacttgugg

20

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of c  
-ki-ras oncogene."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleot  
ides are deoxyribonucleotides"

<400> 127

ctattgttgg atcatatucg

20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of c-ki-ras oncogene.

<400> 128

gactgaatat aaacttgttg

20

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of c-ki-ras oncogene.

<400> 129

ctattgttgatcatattcg

20

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of verotoxin-2 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157."nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

cleotides”

<400> 130

gacttttcga cccaacaaag

20

<210> 131

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of v  
erotoxin-2 encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157.”nu  
cleotides 18 to 20 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonu  
cleotides”

<400> 131

atatccacag caaataacu

20

<210> 132

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encod  
ing sequence from mouse.

<400> 132



cacaaggcca catcgattt c

21

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of INOS-encoding sequence from mouse.

<400> 133

tgcataccac ttcaaccga g

21

<210> 134

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19.

<400> 134

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatg

25

<210> 135

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplify a portion of plasmid pUC19.

<400> 135

gataacactg cggccaactt acttc

25

<210> 136

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as SEA-1 to amplify a portion of Staphylococcus aureus."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 136

tgtatgtatg gtggtgtaac g

21

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric ligonucleotide primer designated as SEA-2 to am

plify a portion of Staphylococcus aureus."nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 137

taaccgtttc caaaggtacu g

21

<210> 138

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as HCV-F3 to amplify a portion of HCV. "nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 138

gcgtctagcc atggcguaa

19

<210> 139

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> DNA-RNA chimera

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as HCV-R1 to amplify a portion of HCV. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 139

gcagaccact atggcucu

18

<210> 140

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MF2 to amplify a portion of pUC19 plasmid DNA.

<400> 140

ggatgtgctg caaggcgatt aagttggta

30

<210> 141

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1 to amplify a portion of pUC19 plasmid DNA.

<400> 141

tttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt

30

<210> 142

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of adenovirus

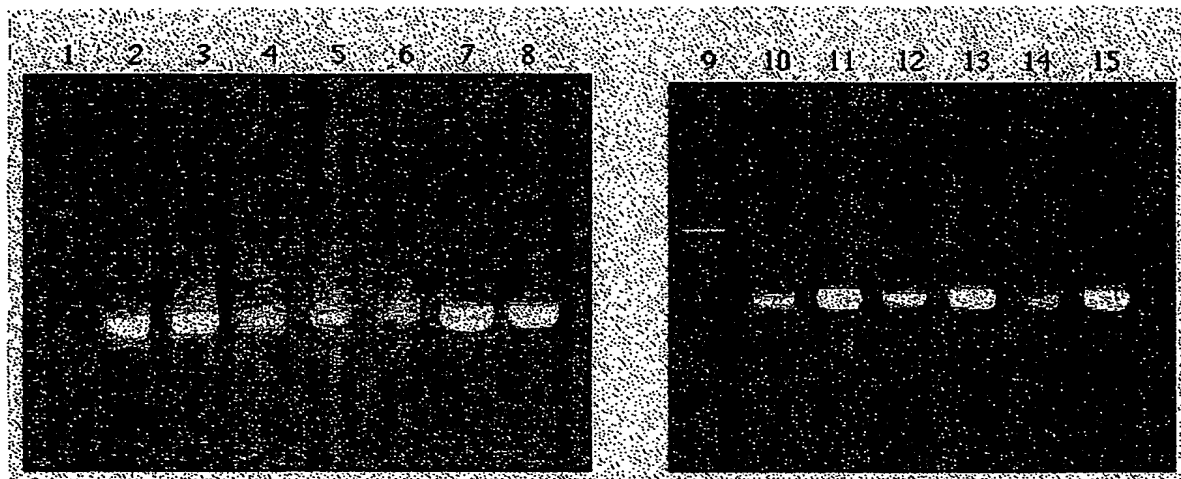
<400> 142

ttatcagcca gtacctcttc g

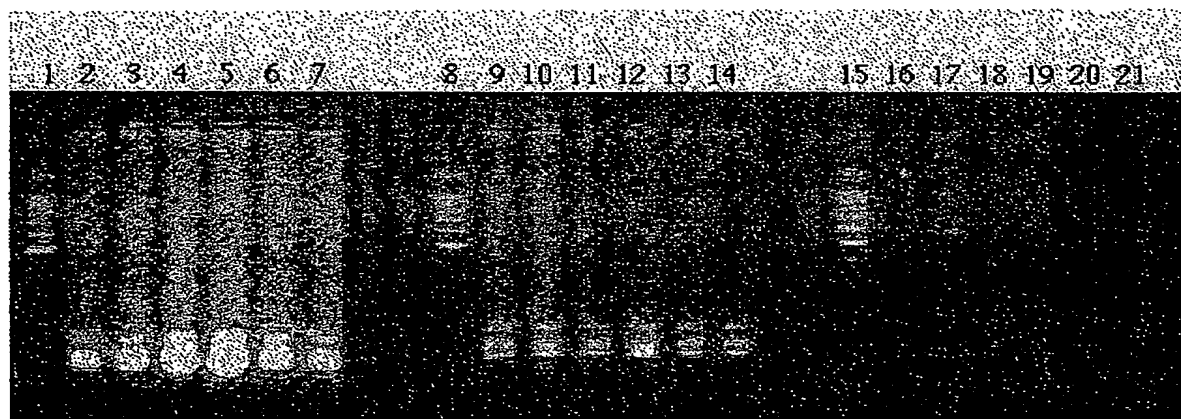
21

【書類名】 図面

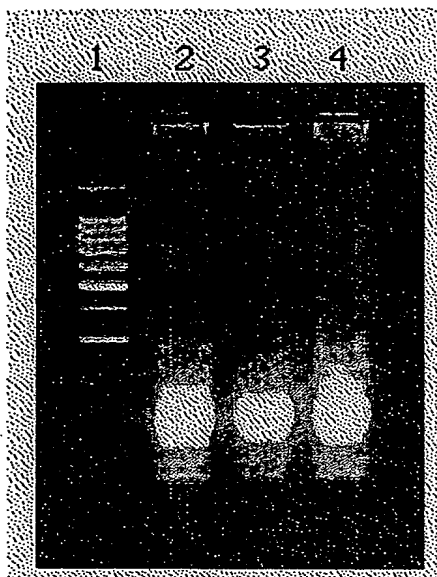
【図 1】



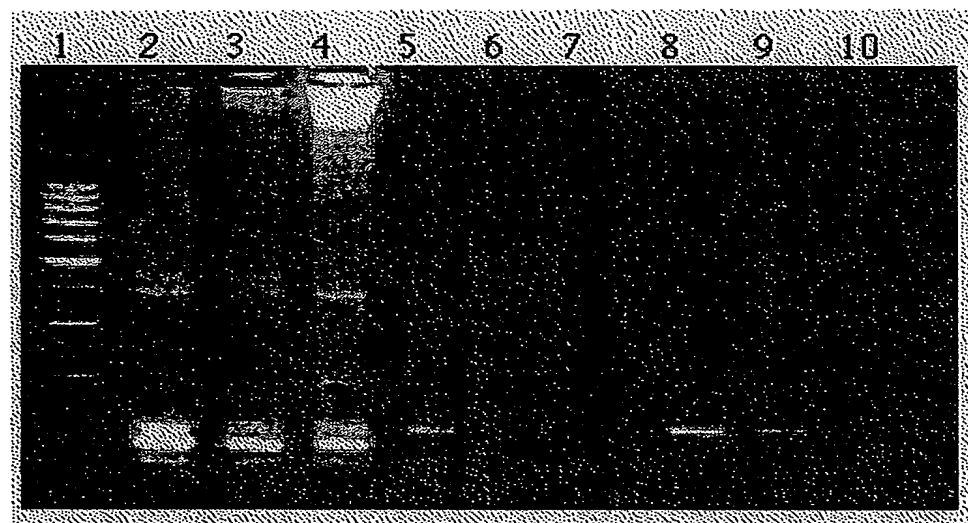
【図 2】



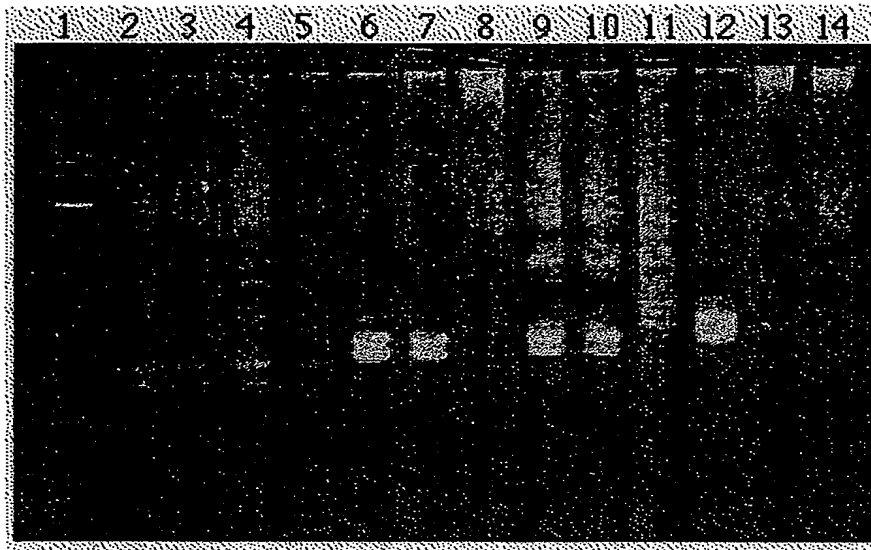
【図3】



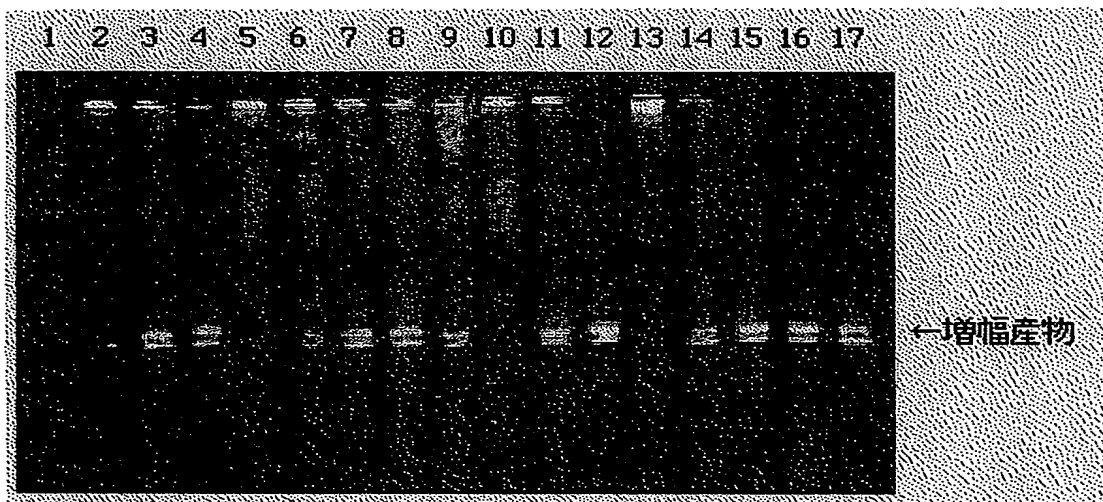
【図4】



【図5】

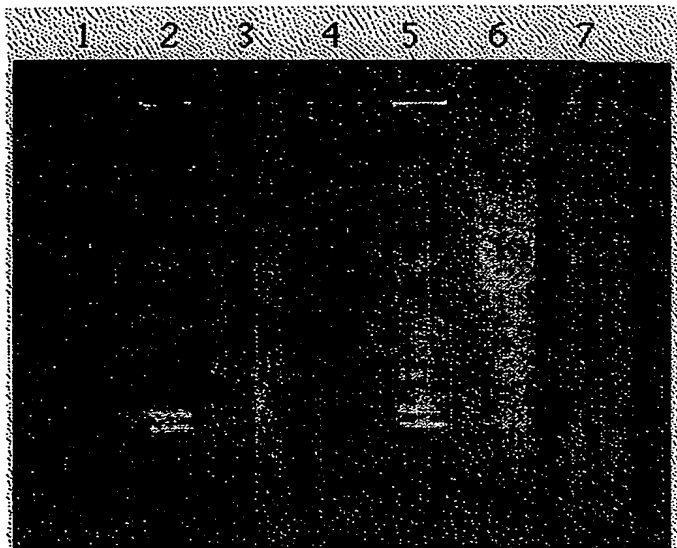


【図6】

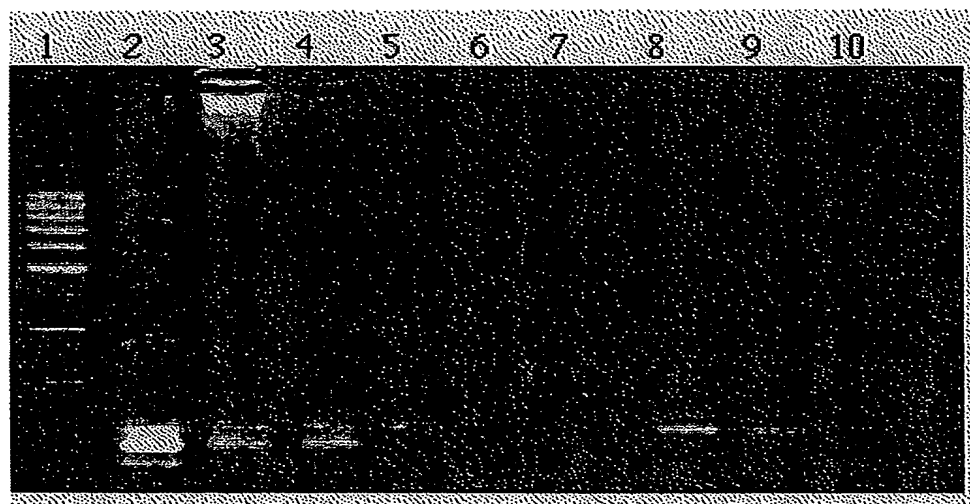




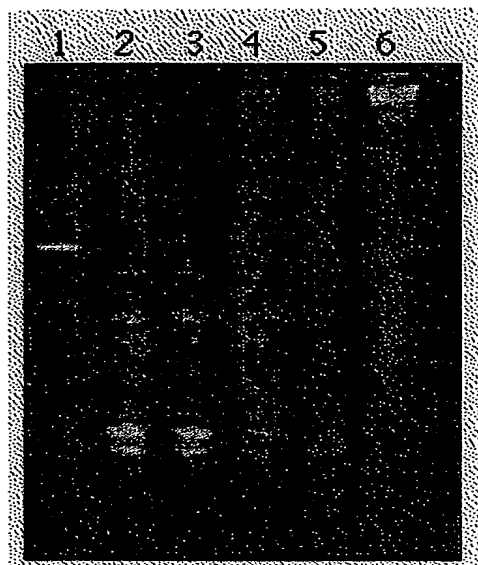
【図 7】



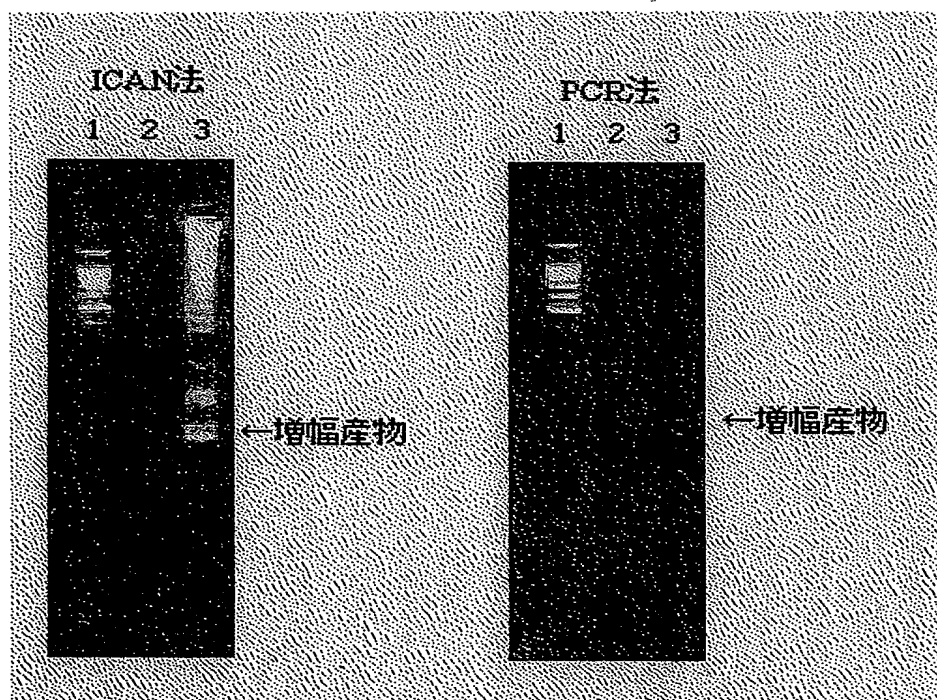
【図 8】



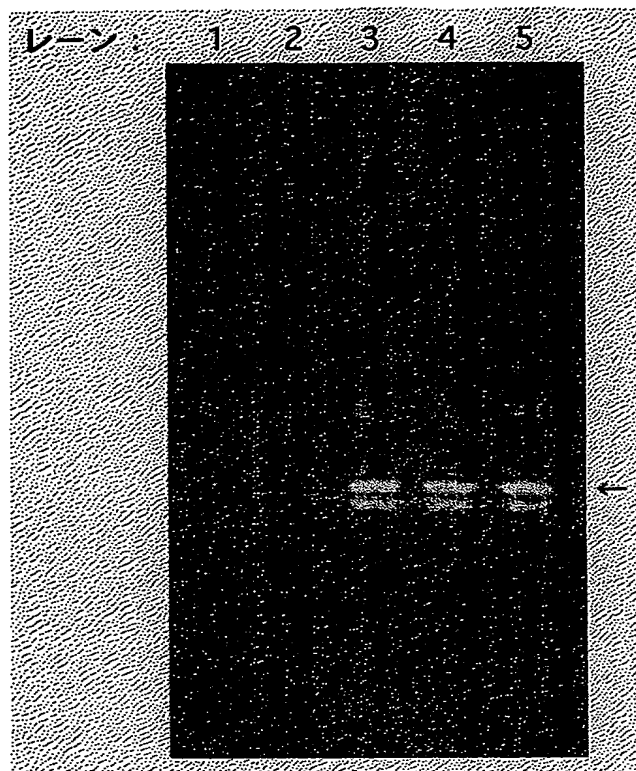
【図 9】



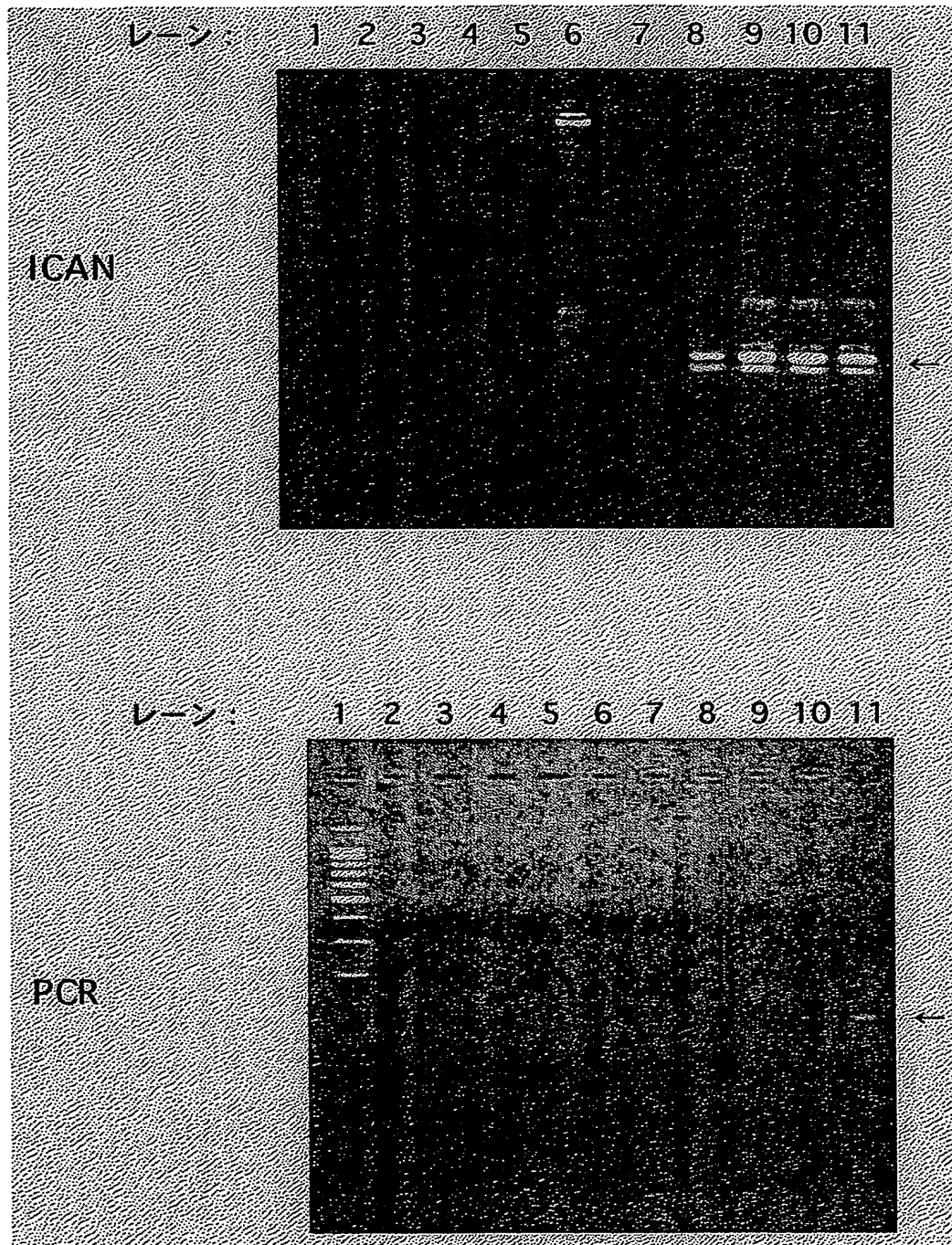
【図 10】



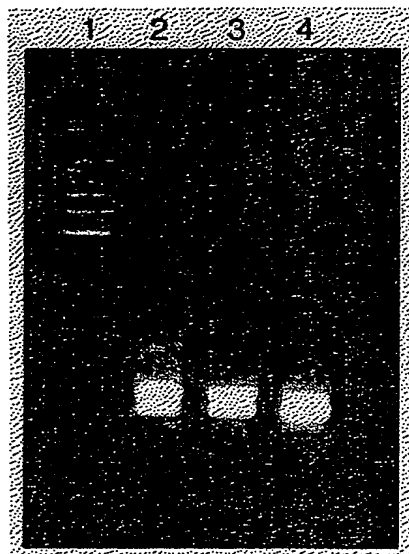
【図 1 1】



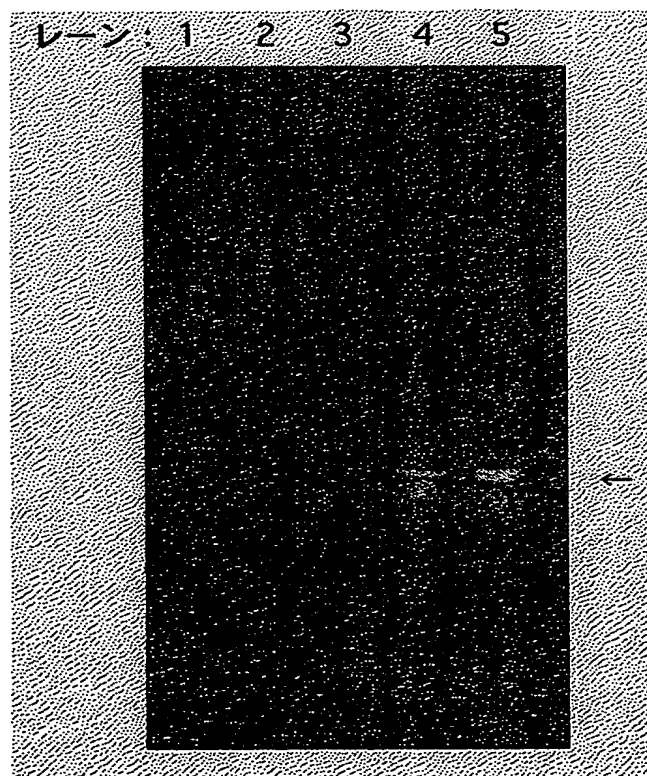
【図 1 2】



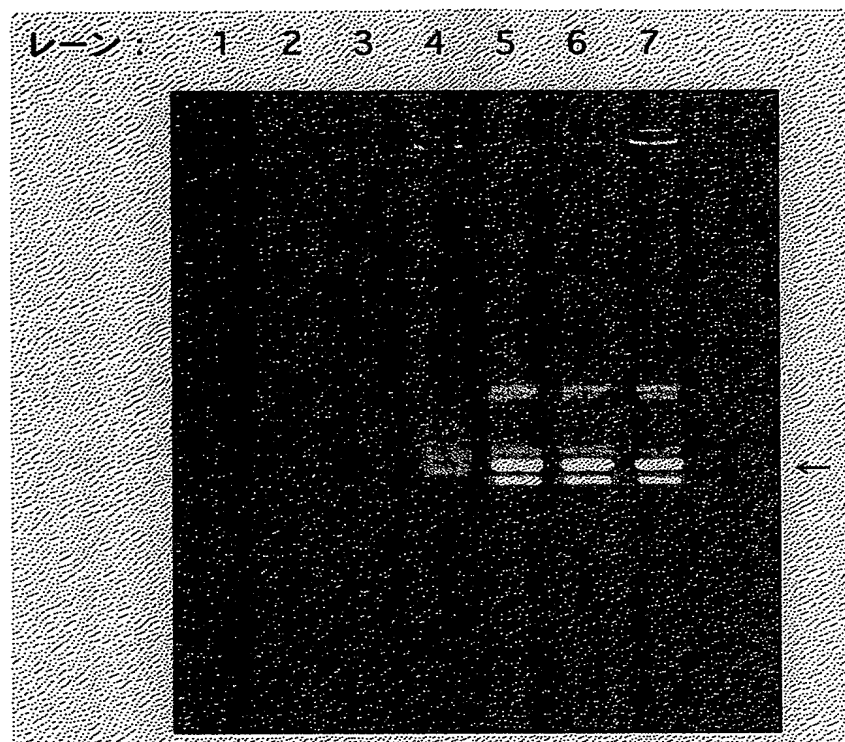
【図13】



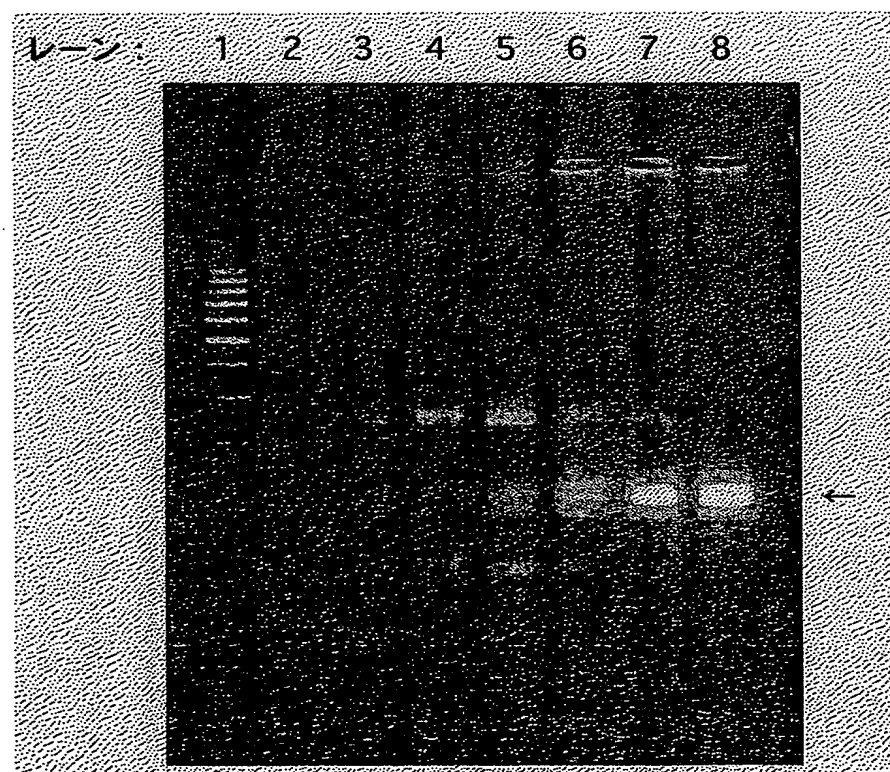
【図14】



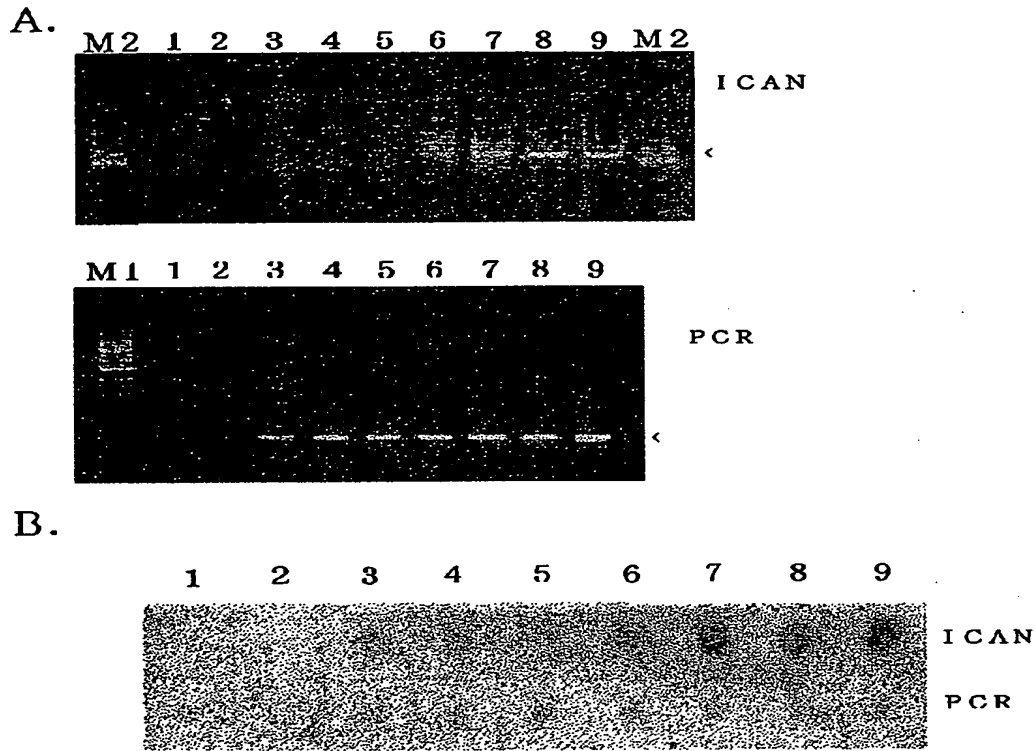
【図 15】



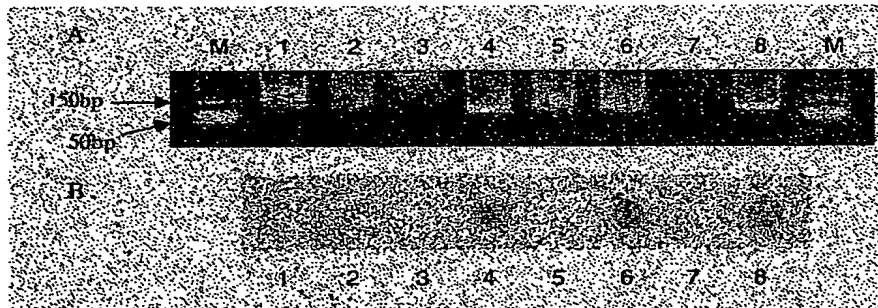
【図 16】



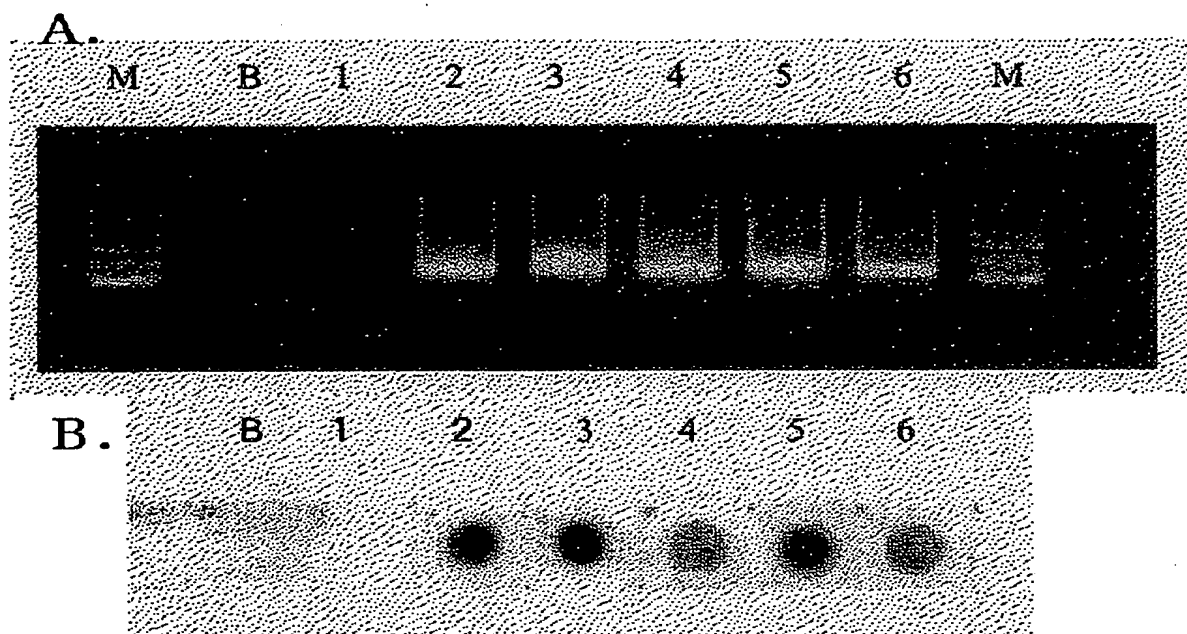
【図17】



【図18】

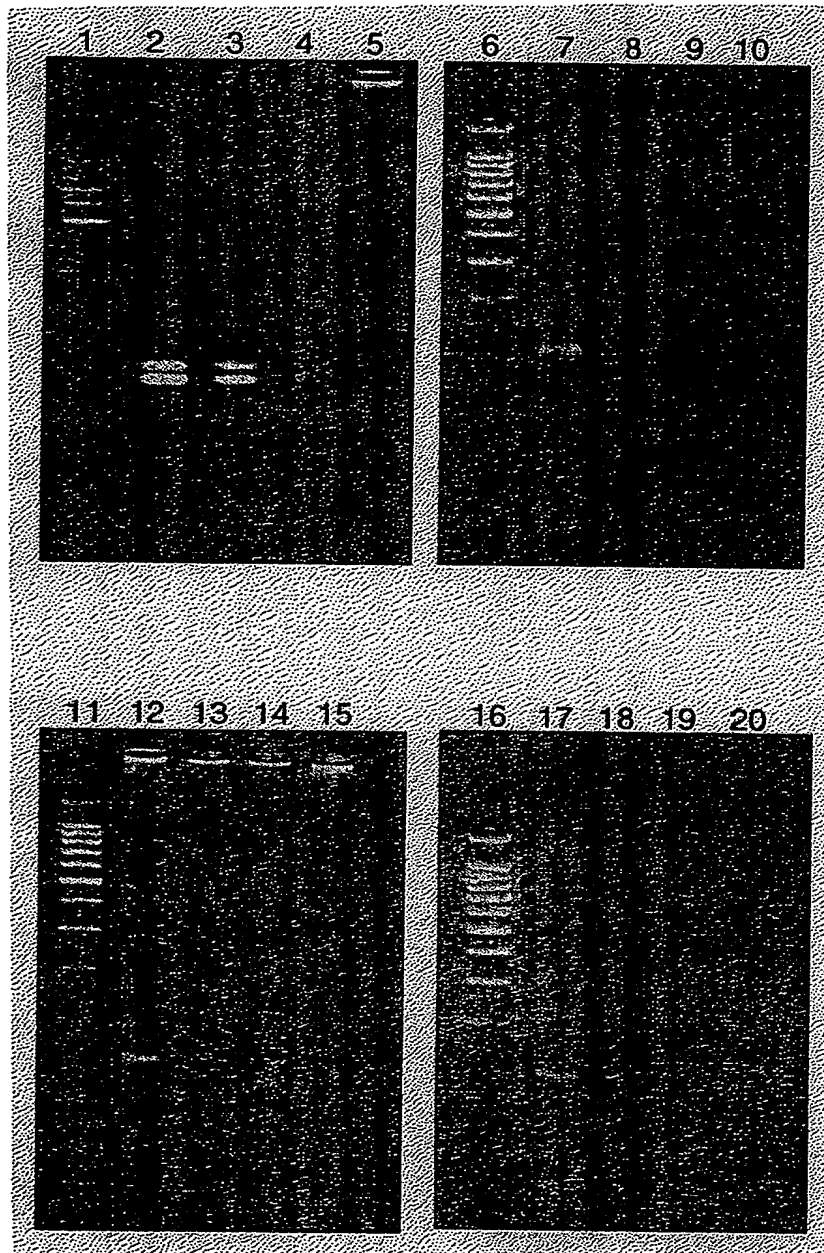


【図 19】

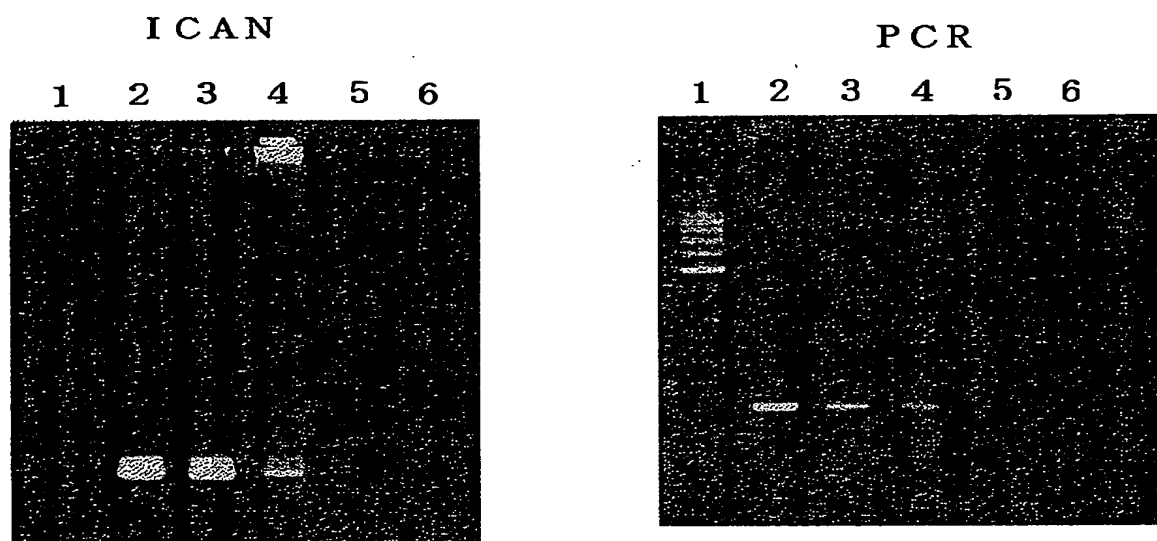




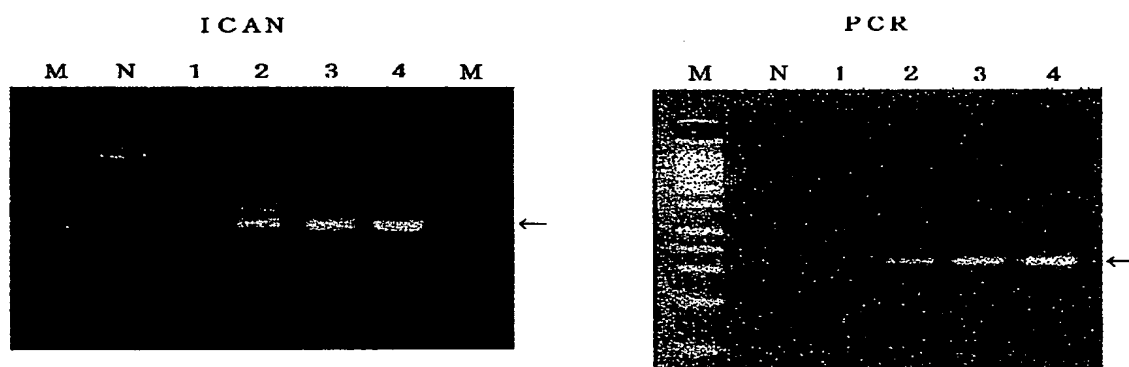
【図 2 0】



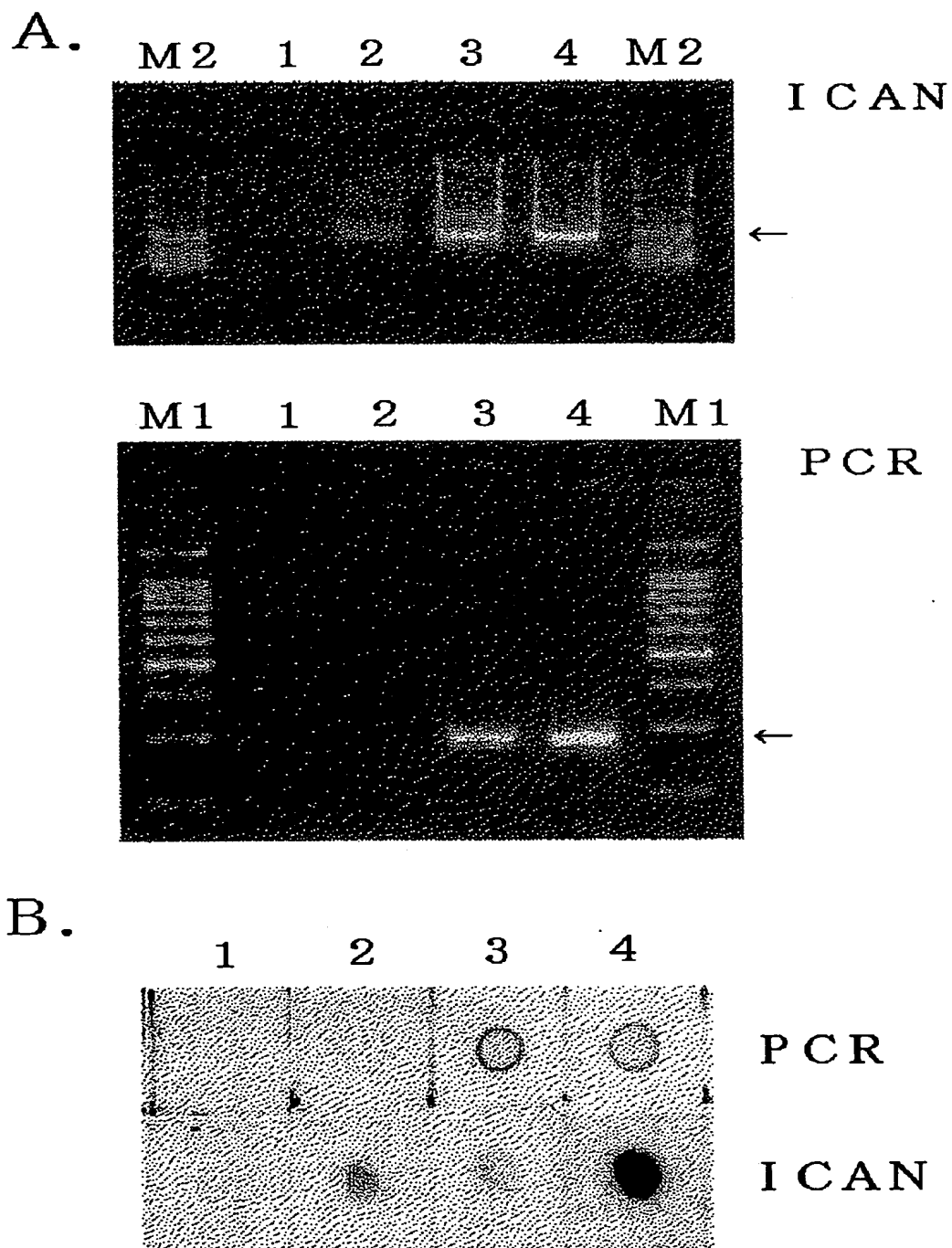
【図 2 1】



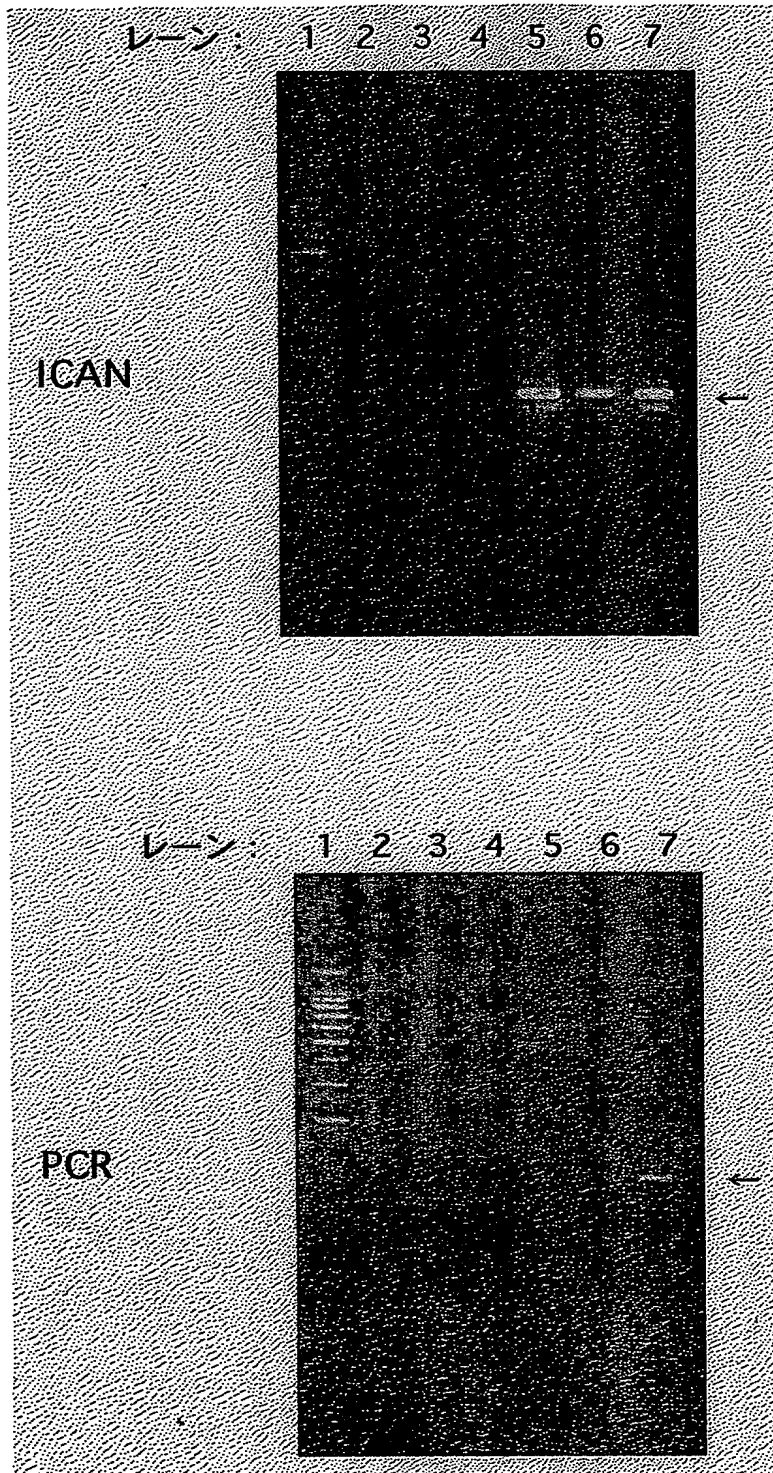
【図 2 2】



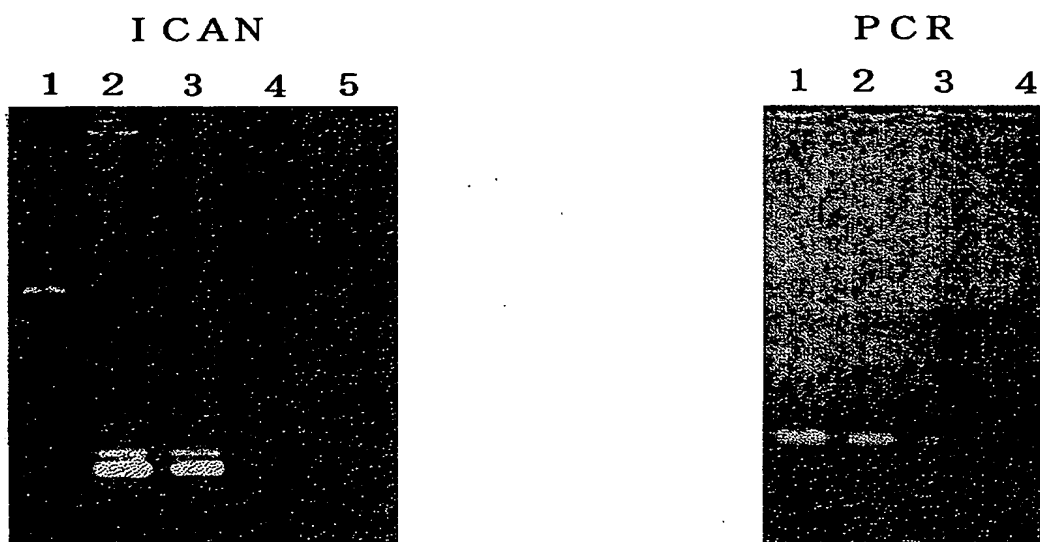
【図23】



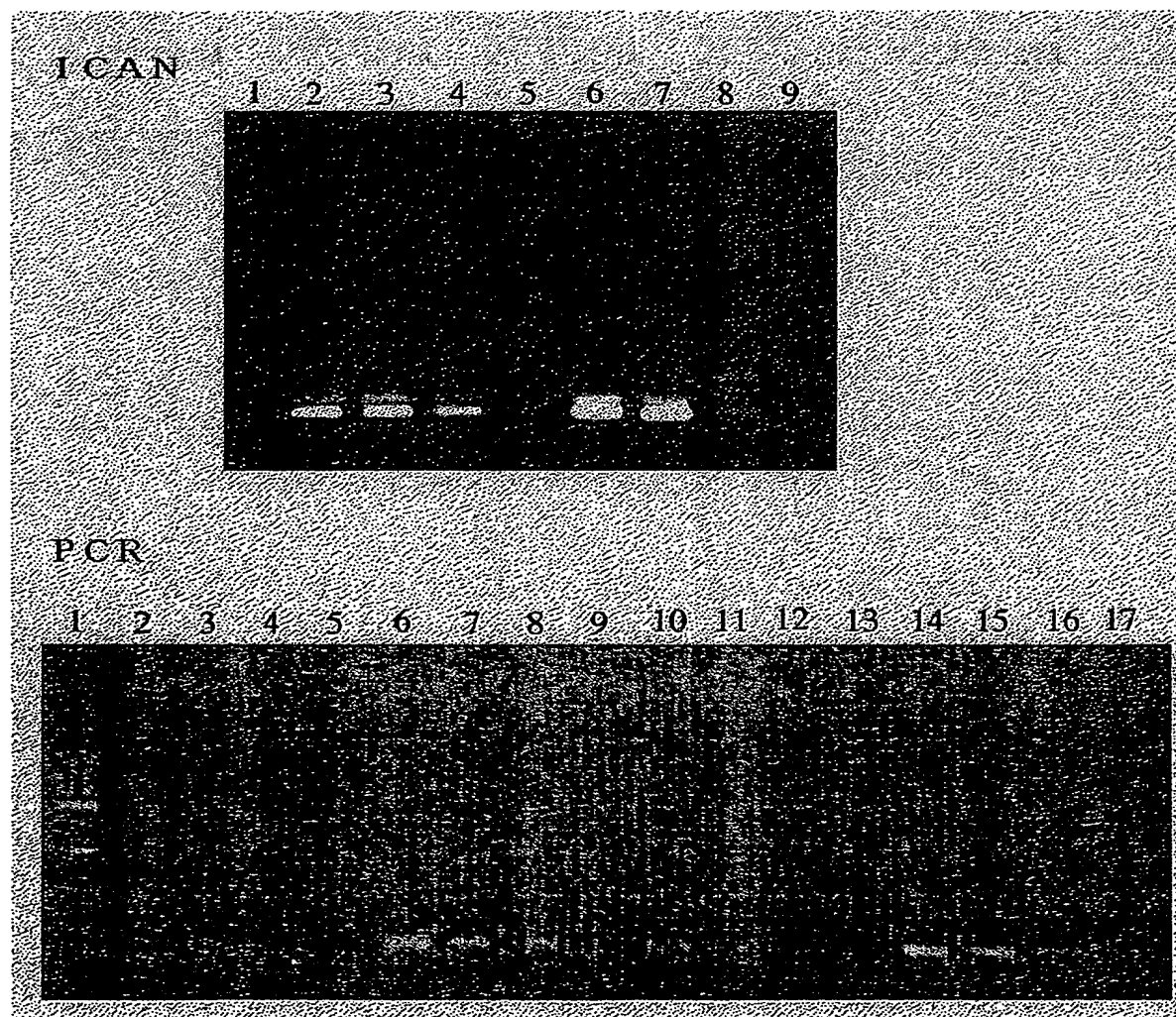
【図 2 4】



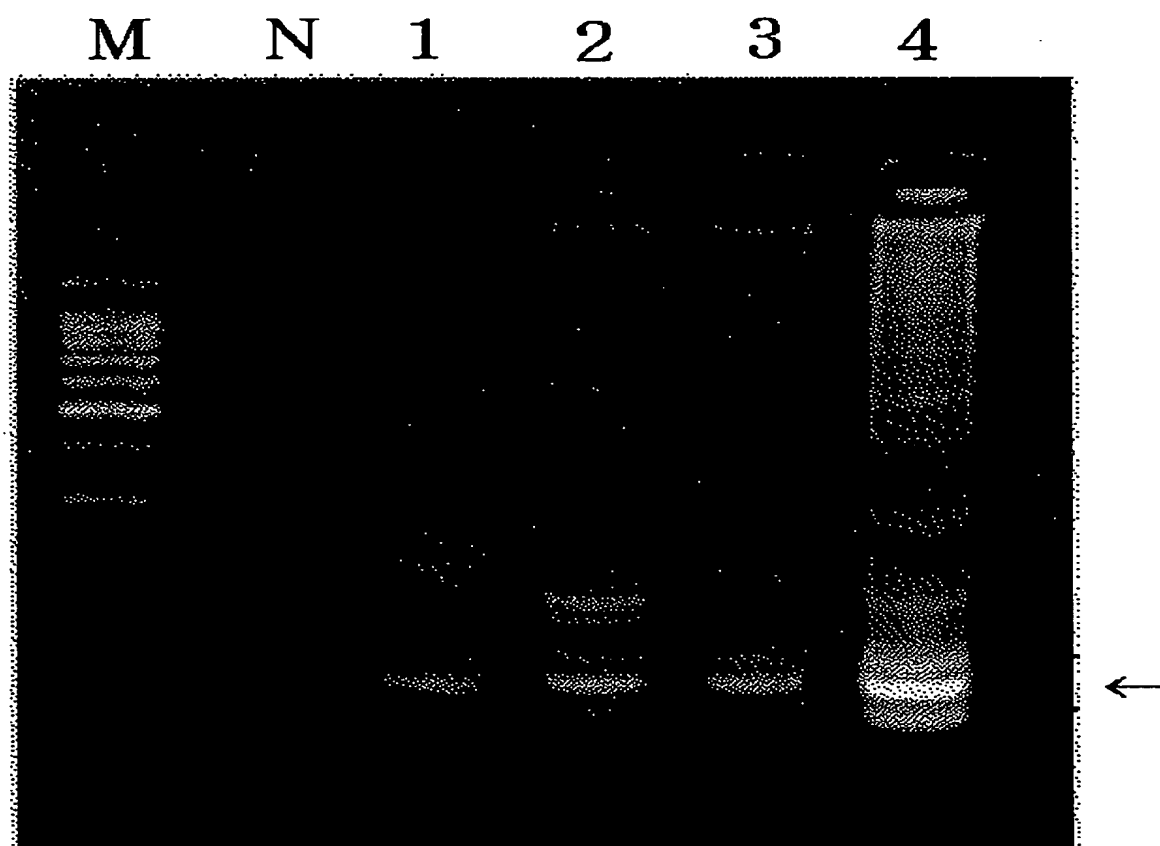
【図 25】



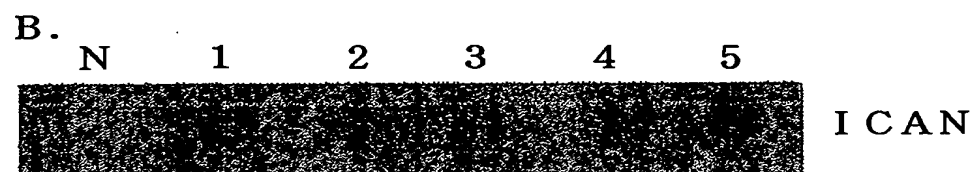
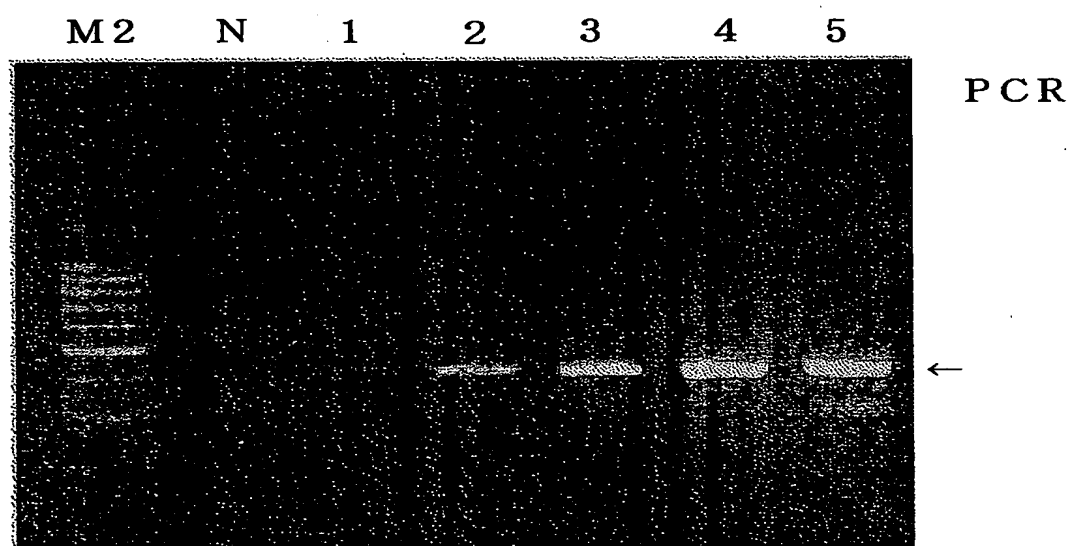
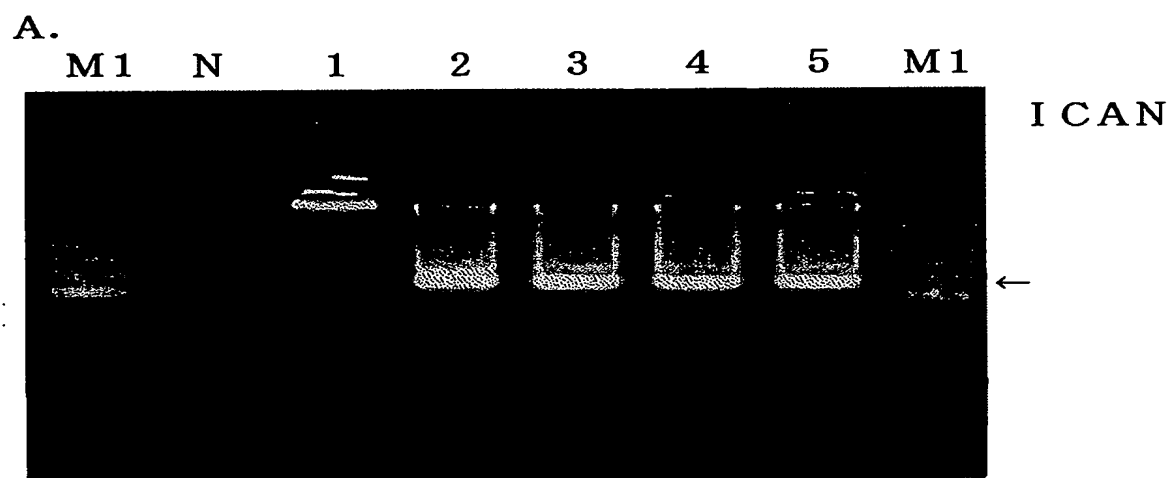
【図 26】



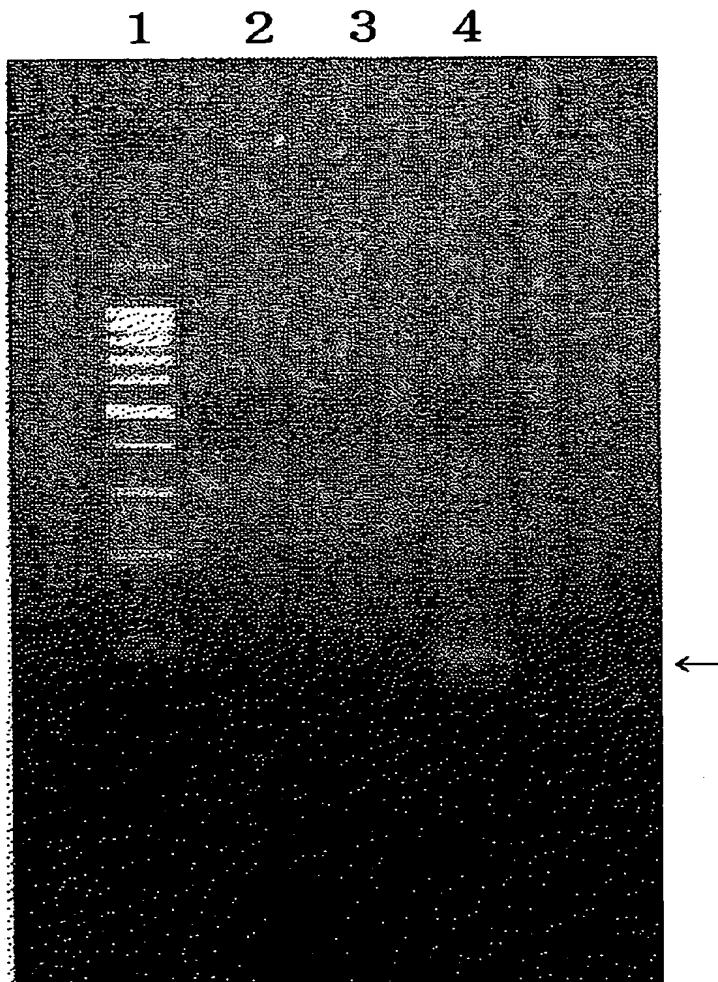
【図 2 7】



【図 28】

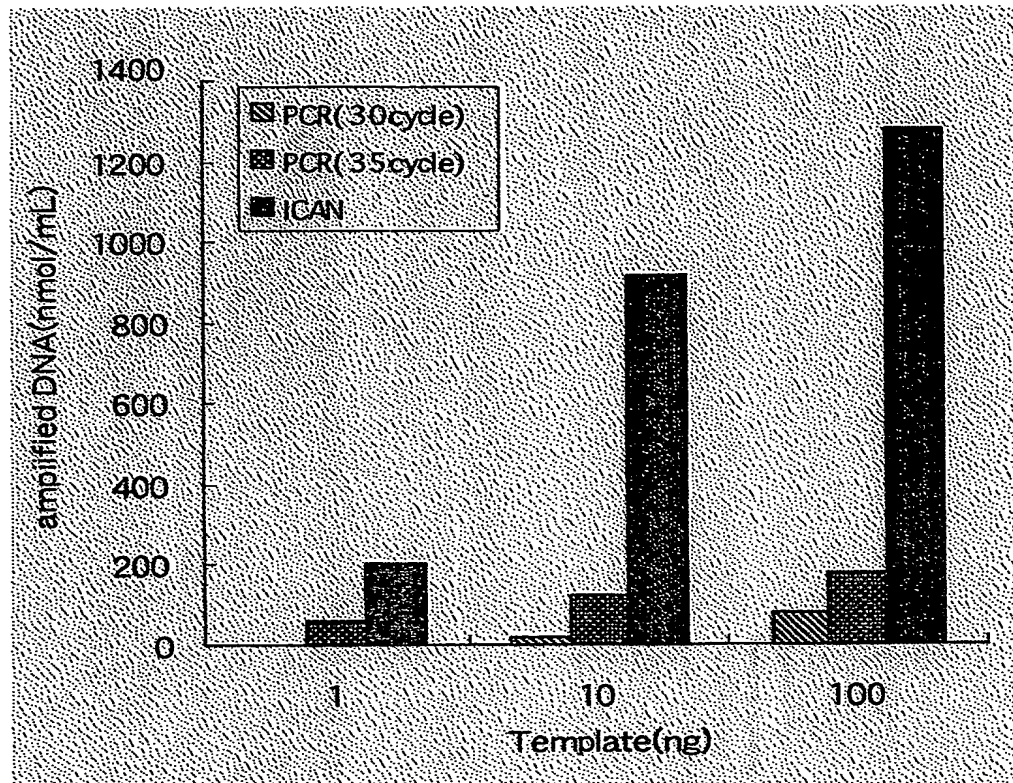


【図 2 9】



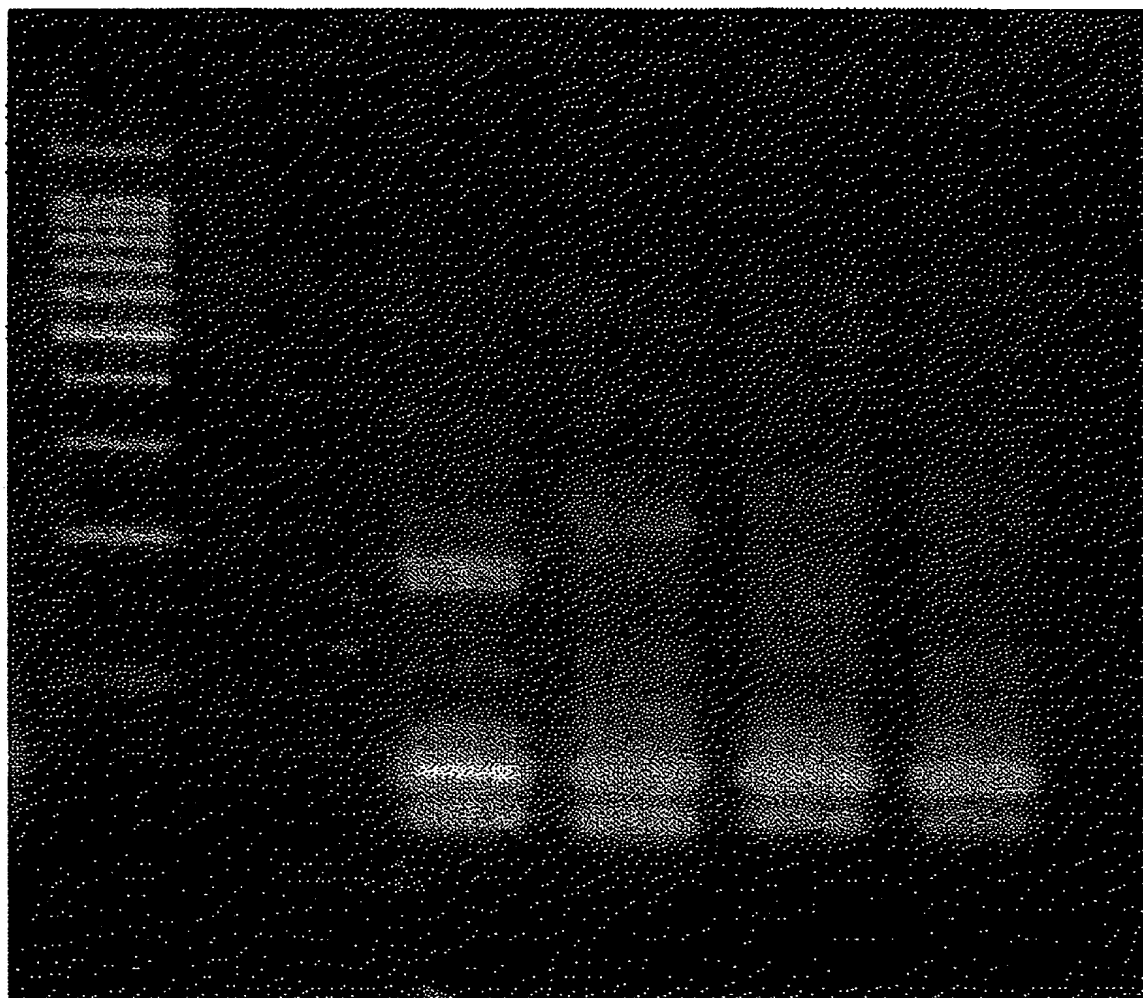


【図 3 0】

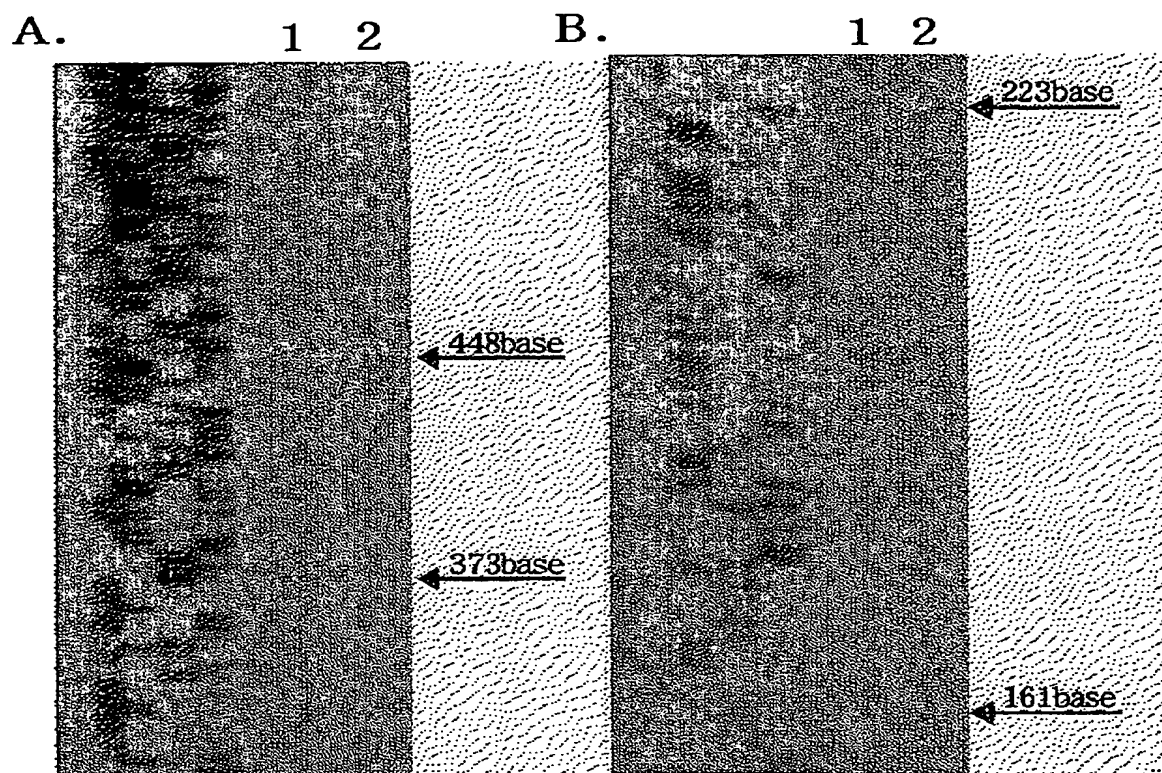


【図31】

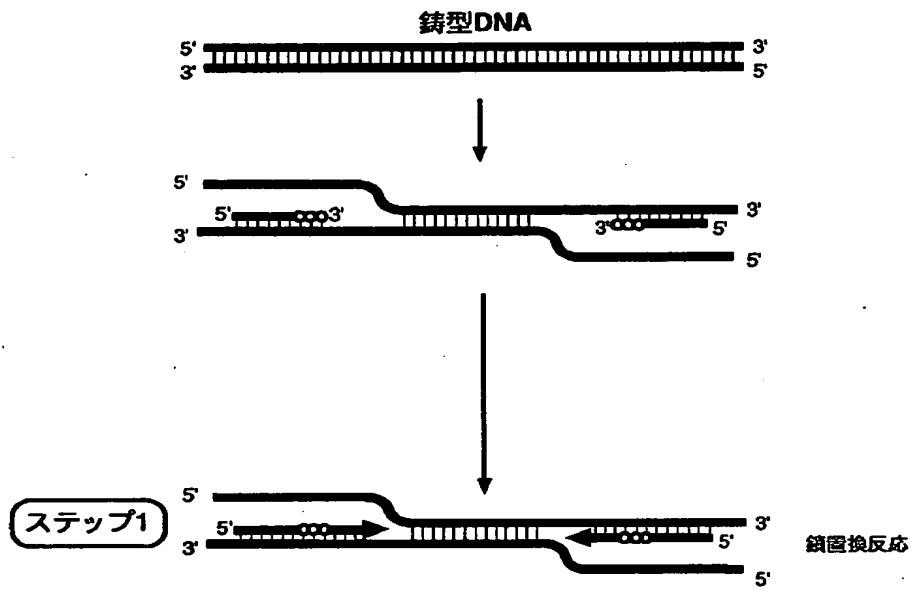
1 2 3 4 5 6



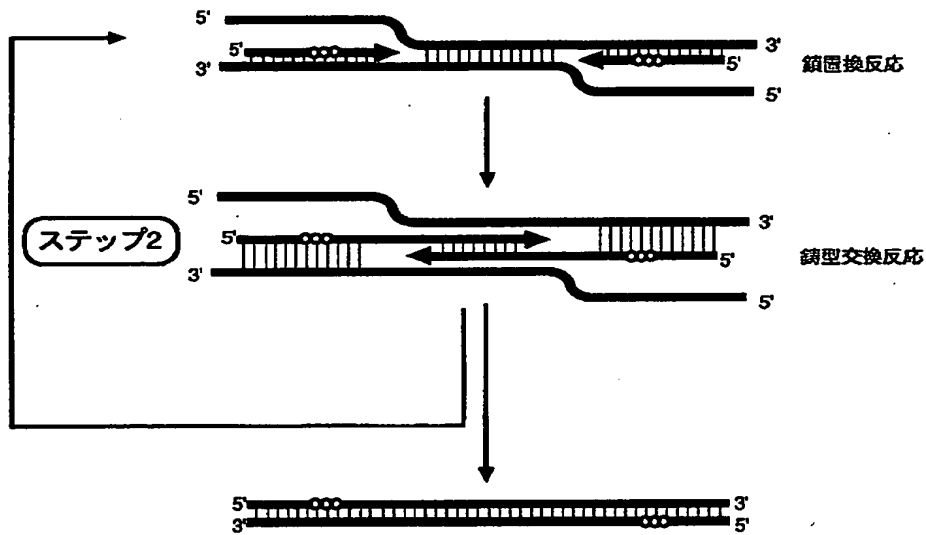
【図 3 2】



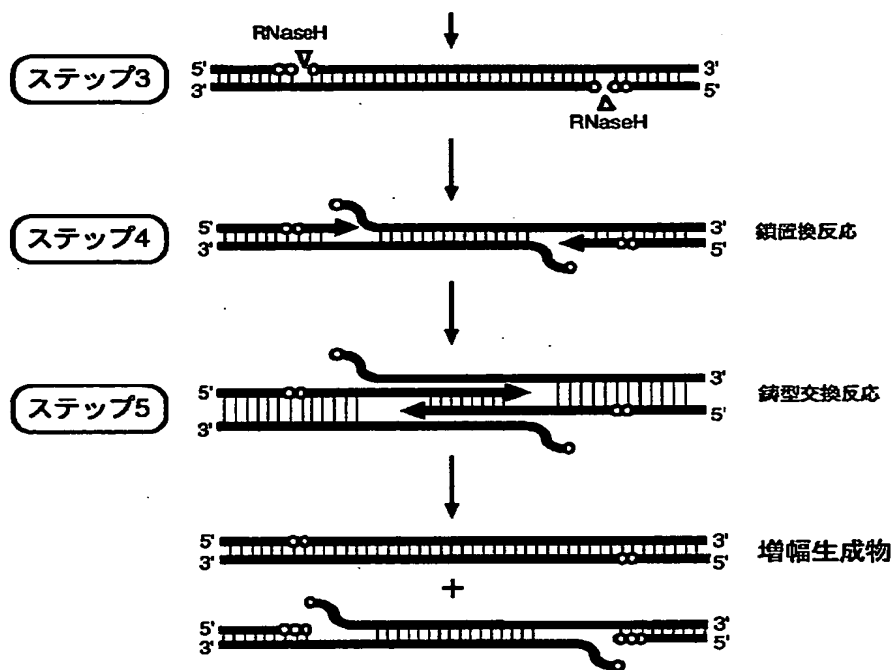
【図33】



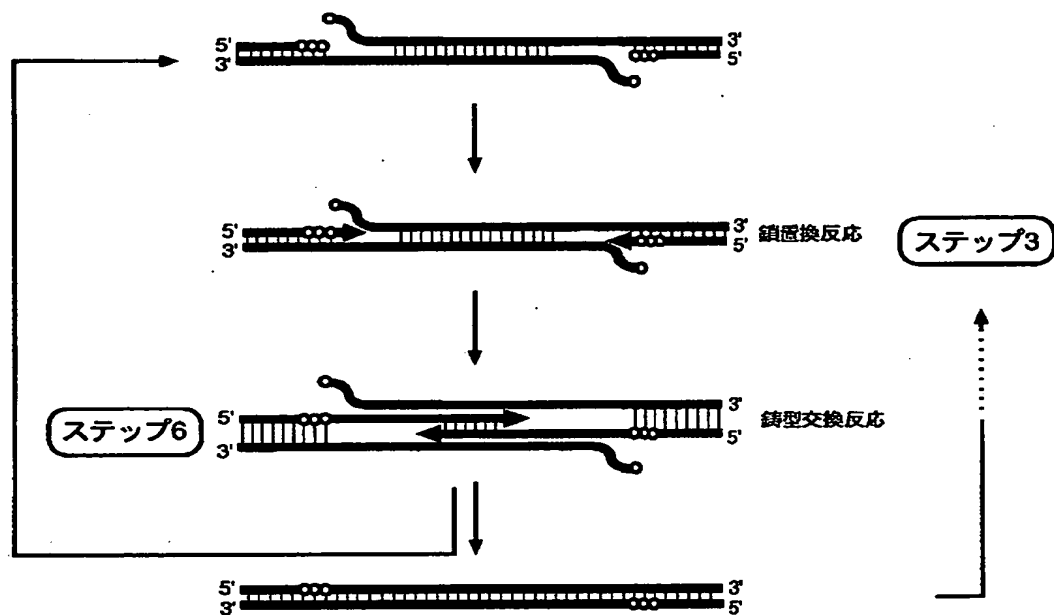
【図34】



【図35】



【図 36】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料中の標的核酸を高感度・特異的に増幅する核酸の増幅方法、該方法を利用した標的核酸の検出方法、該増幅方法を用いた標的核酸の製造方法及びこれらの方法に用いるプライマーを提供すること。

【解決手段】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用した試料中の標的核酸を高感度・特異的に増幅する核酸の増幅方法、該方法によって得られた増幅断片の検出方法、該増幅方法を用いた標的核酸の製造方法及びこれらの方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【選択図】 なし



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 寶酒造株式会社